

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :

G01N 27/403

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/62048

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

19. Oktober 2000 (19.10.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/03404

(22) Internationales Anmeldedatum:

14. April 2000 (14.04.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 16 921.7

14. April 1999 (14.04.99)

DE

PCT/EP99/04883

12. Juli 1999 (12.07.99)

EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUN-
HOFER-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER
ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leon-
rodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALBERS, Joerg [DE/DE];
Dorfstrasse 28h, D-25576 Brokdorf (DE). BERNT, Helmut
[DE/DE]; Oppelner Strasse 40, D-10997 Berlin (DE). BRE-
DEHORST, Reinhard [DE/DE]; Eichenstrasse 55, D-20255
Hamburg (DE). HINTSCHE, Rainer [DE/DE]; Gravenstein-
strasse 61c, D-13127 Berlin (DE). SEITZ, René [DE/DE];
Edendorfer Strasse 174, D-25524 Itzehoe (DE).(74) Anwälte: LEONHARD, Reimund usw.; Leonhard Olgemöller
Fricke, Postfach 10 09 57, D-80083 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: DE, JP, US, europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

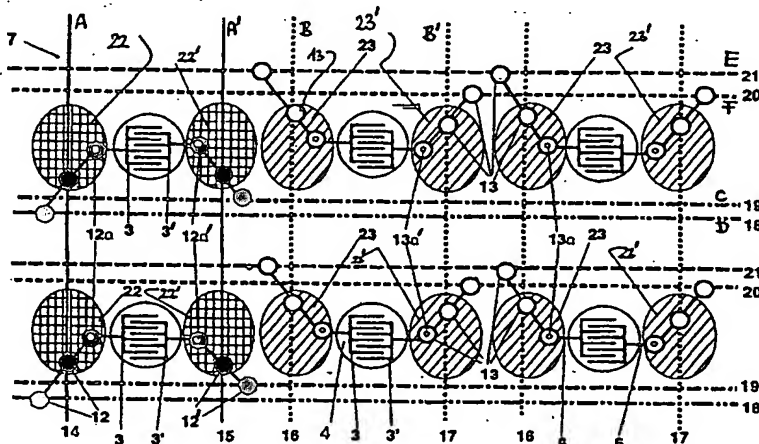
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: SENSOR ARRANGEMENT WITH ELECTRICALLY CONTROLLABLE ARRAYS

(54) Bezeichnung: SENSORANORDNUNG MIT ELEKTRISCH ANSTEUERBAREN ARRAYS

(57) Abstract

Disclosed is an electric sensor array which is provided with several sensor positions that consist of at least two microelectrodes and thereby form an array (4). Molecular substances can be detected electrochemically and charged molecules can be transported or handled by means of said array. Measuring procedures, especially between two respective addressing procedures, are possible according to which the sensor positions can be individually addressed and electrochemically or electrically controlled at any moment. A polarisation voltage between two addressing procedures is thus maintained. The arrangement of the wiring (14, 15; 16, 17) is embodied in such a way that individual arrays or groups of arrays can be controlled. For biomolecular assays, affinity-binding molecules are immobilised in each sensor position, between the microelectrodes or on auxiliary surfaces, thereby representing a possible utilisation of the array. The array can also be used for individual and electrical read-out. The array can further be used for subsequently measuring events between the addressing procedures, whereby said events took place before measurement addressing occurs.



(57) Zusammenfassung

Es wird ein elektrisches Sensorarray vorgeschlagen, das mehrere Sensorpositionen aufweist, die als jeweils ein Array (4) aus zumindest zwei Mikroelektroden bestehen. Mit diesem Array können molekulare Stoffe elektrochemisch detektiert werden, geladene Moleküle können transportiert oder gehandhabt werden. Ebenfalls möglich sind Messvorgänge, insbesondere zwischen zwei jeweiligen Adressiervorgängen, nachdem die Sensorpositionen individuell adressierbar sind und jederzeit elektrochemisch bzw. elektrisch kontrollierbar sind, zur Aufrechterhaltung einer Polarisierungsspannung zwischen zwei Adressiervorgängen. Die Leitungsführung (14, 15; 16, 17) ist so ausgebildet, dass einzelne Arrays oder Gruppen von Arrays ansteuerbar sind. Für Biomolekulare Assays werden affinitätsbindende Moleküle an jeder Sensorposition oder zwischen den Mikroelektroden oder auf Hilfsflächen immobilisiert, was eine mögliche Verwendung des Arrays ist. Eine weitere liegt in der individuellen elektrischen Auslesung und der Möglichkeit, zwischen den Adressiervorgängen abgelaufene Ereignisse nachträglich zu messen, die vor der Messadressierung abgelaufen sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Sensoranordnung mit elektrisch ansteuerbaren Arrays

Die Erfindung betrifft ein elektrisches Sensorarray, das aus multiplen Ultramikroelektroden als elektrochemischen Transduktoren besteht und zum gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Molekülen aus Substanzgemischen in der biochemischen Analytik der medizinischen Diagnostik und der Umweltüberwachung als Teil von Meßanordnungen verwendet werden kann. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung analytischer Prozesse.

Für die analytische Untersuchung biochemischer Assays ist es erwünscht, mehrere Analyte gleichzeitig in sogenannten Arrayanordnungen zu detektieren. Solche Arrays sind auf der Basis optischer Detektion weit verbreitet. Es wäre von Vorteil, direkt elektrische Meßsignale ohne Umweg über optische Detektionshilfen zu erfassen und auf diese Weise partikeltolerant und volumenunabhängig zu messen. Die elektrische Detektion würde Preisvorteile und robustere Handhabung ermöglichen.

Ausgehend vom klassischen Elektrodensystem zur elektrochemischen Detektion gibt es umfangreiche Bemühungen, Elektroden zu miniaturisieren. Mit dem Begriff bezeichnet man üblicherweise elektrochemisch genutzte Elektrodenstrukturen in Dimensionen unter 5 µm. R.M. Wightman und D.O. Dipf beschreiben Möglichkeiten der Voltammetrie an Ultramikroelektroden in *Electroanalytical Chemistry*, Ed.A.J. Bard (Marcel Dekker, New York 1988) Vol.15, p.267.

Solche Ultramikroelektroden ermöglichen auch besondere Detektionsverfahren wie das Redox-Recycling, vgl. O. Niwa et al., *Electroanalysis* 3(1991)163-168, das besonders für biochemische Affinitätsassays mit Enzymmarkierung, wie sie bei Immuno- und DNA-Assays üblich sind, vorteilhaft eingesetzt werden kann. Elektrodenstrukturen unter 300nm Strukturbreiten ermöglichen die markerfreie Detektion der Affinitätsbindung großer Moleküle an elektrodengebundene Fängermoleküle mittels der Impedanzspektroskopie, vgl. auch DE-A 196 10 115.

Ein Paar planarer Interdigitalelektroden für konduktometrische und voltametrische Messungen bezeichnen Sheppard et al. in *Anal. Chem.*, 65(1993)1202 als Array.

Ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden in Siliziumtechnologie verwendeten Aoki et al. [*J. Elektroanal. chem.*, 79 (1997) 49] für reversible Redoxreaktionen, das sogenannte Redox-Recycling.

Wiederum ein einzelnes interdigitales Elektrodenpaar wurde von H.T. Tang et al. [Anal. Chimica Acta, 214(1988) 187] als Detektorsystem für ein Immunoassay, bestehend aus einem Antigen und einem Antikörper genutzt.

- 5 Alle diese Anordnungen wurden aber nur zur Einzelanalytbestimmung beschrieben, so daß arraytypische unterschiedliche Molekülspezies nicht einzelnen elektrisch detektiert werden konnten.

- 10 Mikroelektrodenarrays mit 16 parallelen Bandedelektroden und 0,1 mm Elektrodenbreite wurden von Aoki et al. Anal. Chem. 64(1992)44 zur elektrochemischen Detektion beschrieben. Dabei werden unterschiedliche Polarisierungsspannungen an den einzelnen Bandedelektroden angelegt und konstant gehalten. Die Elektroden werden seriell im msec-Takt ausgelesen, ohne daß den Einzelelektroden Schalter zugeordnet sind. Ein Tiefpaßfilter verhindert das Auftreten von Ladeströmen. Diese Anordnung ermöglicht nur
15 die Detektion einzelner oder verschiedener elektrodenaktiver Spezies in Lösung.

- Eine Weiterentwicklung interdigitaler Elektrodenpaare zu einem Array mit multiplen interdigitalen Elektroden wurden in DE 4318519 zum simultanen Betrieb an einem Multipotentio-
20 staten angegeben. Bei diesem Verfahren werden die Potentiale an den Elektroden individuell kontrolliert und konstant gehalten. Das Array ist auch nur zur simultanen und parallelen Messung eines Analyten in Lösung geeignet. Ebenfalls mit einem Multipotentio-
staten wurden 4 Felder mit punktförmigen Mikroelektroden parallel zur Bestimmung verschiedener Metalle mittels anodischem Strippingverfahren beschrieben (DE 4424355C2). Das Verfahren erlaubt nur die spezielle
25 Stripping-Voltammetrie als Detektionsverfahren, wobei mit Hilfe der Square-wave-Voltammetrie Spannungsrampen aufmoduliert wurden.

- Das Prinzip einer voltametrischen parallelen Multikanalmessung an Mikroelektrodenarrays ist in Elektroanalysis 8, 10 (1996) 891, aufgezeigt. Ein
30 Elektrodenarray mit 1 bis 2 µm großen Querschnitten von eingebetteten Kohlefasern benutzten T.G. Strein und A.G. Ewing [Analytical Chemistry 65 (1993) 1203]. Beide Verfahren gestatten keine serielle elektrische Abfrage verschiedener Sensorpositionen.

- Yon Hin et al. [Sensors and Actuators B1(1990)550] beschreiben ein Multianalyt-
35 Elektrodenarray bestehend aus mäanderförmigen parallelen Elektrodenbändern zur parallelen Analyse von Glukose und Galaktose mittels Leitfähigkeitsmessung. Dazu wurden Glukoseoxidase und Galactosidase in leitfähigem Polypyrol auf den Elektrodenoberflächen einpolymerisiert, gesteuert durch die Elektropolymerisation. Da

dieses Array die elektrische Leitfähigkeit als Detektionsgröße nutzt, sind Schaltvorgänge im Hinblick auf Störungen bei der Voltametrie ohne Bedeutung.

Ein nanostrukturiertes Goldelektrodenarray zur Immunodetektion wird von C. R. Musiel et al. [Journal of Vacuum Science and Technology B13 (6)(1995)2781] beschrieben. Dieses Elektrodenarray ist durch das Herauslösen von Nanopartikeln aus einer auf Gold aufgetragenen Isolationsschicht stochastisch verteilt und kann nicht individuell adressiert und ausgelesen werden.

Im US Patent 5,605,662 ist ein Elektrodenarray individuell ansteuerbarer Einzelelektroden mit ca. 30µm Durchmesser und davon separierten größeren Gegenelektroden auf einem Siliziumchip angegeben. Dieses Array wird nicht zur elektrochemischen Detektion, sondern nur zur Adressierung und Felderzeugung zwischen gelbeschichteten Einzelelektroden und den am Rande dieses Arrays angeordneten Gegenelektroden benutzt. Mit dem erzeugten Feld werden geladene Moleküle auf individuelle Elektrodenpositionen transportiert oder durch entgegengesetzte Polarisation von diesen Feldern entfernt. Für einen konkreten Fall ist dies für das Anreichern von DNA im Gel über individuellen Elektroden zur DNA-Hybridisierung an Fängern und im umgekehrten Fall das Beseitigen von Mismatches durch Feldunterstützung der DNA-Stringenzbehandlung beschrieben [R.G.Sosnowski et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94 1997)1119]. Die Anwendung dieses Systems zur molekularbiologischen Multianalytidiagnostik ist in US 5,563,957 beschrieben, wobei der elektrische Transport mit optischer Detektion gekoppelt ist.

Ein Array zur potentiometrischen Anwendung mit mehr als tausend individuell adressierbaren Elektrodenelementen wird von T. Hermes et al. in Sensors and Actuators B 21(1994)33 beschrieben. Die Einzelpositionen dieses Sensorarrays werden nur zum Zeitpunkt der Auslesung aktiv angeschaltet, während im Nichtlesezustand keine Spannung anliegt und keine Reaktion stattfindet. CMOS-Schalter für dieses An- und Ausschalten der Elektroden sind an jeder Arrayposition individuell angeordnet. Ein analog aufgebautes Multielektrodenarray mit nMOS-Schaltern an jeder Sensorposition wurde von Fiaccabriono G. C. et al. Sensors and Actuators B, 18 – 19 (1994) 675 beschrieben. Bei dieser Art von Arrays entstehen beträchtliche Ladeströme, die amperometrische Detektionsverfahren stark beeinträchtigen. Ein Array von 19 Iridiumelektroden mit 10 µm Durchmesser als einzeln adressierbare Elektroden beschreiben S.P. Kounaves et al. in Anal. Chem. 66(1994)418. Die Elektroden wurden seriell in 2-Elektrodenteknik ausgelesen und nur im Lesezustand mit einem Potential belegt.

Ein Überblick über die Elektrochemie an Ultramikroelektroden ist zu finden in Physical Electrochemistry, Ed. Rubinstein, Marcel Dekker, 1995 New York, p. 131–208.

Die Applikation eines Paares von 20 – 300 nm-strukturierten Interdigitalelektrodenarrays zur markerfreien Impedanzanalyse einer Molekülkonjugation auf den Elektrodenoberflächen wurde in DE-A 196 10 115 beschrieben. Ein einzelnes Paar nanostrukturierter Interdigitalelektroden für die Admitanzspektroskopie gelöster Moleküle wurde in J. Vac. Sci. Technol. A 13 (3) (1995) 1755 beschrieben. Das analoge Prinzip der Impedanzmessung im Elektrodenzwischenraum immobilisierter Moleküle mittels eines interdigitalen Paares schattenartig an eine Grubenwand gedampfter Nanometerelektroden ist in PCT/EP 96/05290 gezeigt. Bei allen beschriebenen Impedanzmessungen mit Ultramikroelektroden wurde ein interdigitales Elektrodenpaar in Zweipol-Technik an ein kommerzielles Impedanzmeßgerät angeschlossen.

Eine besondere Form individuell adressierbarer sub- μm -Bandeletrodenarrays sind von M. P. Nagale und I. Fritsch in Analytical Chemistry 70,14 (1998) 2902 als gestapelte, voneinander isolierte Dünnschichtelektroden beschrieben. Dabei sind die Querschnitte der Stapel als aktive Elektroden verwendet worden. Zur elektrochemischen Kontrolle wurde ein kommerzieller computergestützter Potentiostat mit Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode verwendet. Die Auslesung der 15 Elektrodenschichten erfolgte seriell durch An- und Ausschalten.

Ein Mikroelektrodenarray zur extrazellulären Aktivitätsmessung und Stimulation lebender Zellen und neuronaler Gewebe benutzt individuell adressierbare Mikroelektroden von 14 μm im Durchmesser, die mittels eines CMOS VLSI-Chips zur Stimulation und zur Detektion eingesetzt werden, wobei jede Chipelektrode zellulär erzeugte Biopotentiale zwischen 0,9 – 2,1 mV und 100 – 400 μV individuell erfassen kann [J.J. Pancrazio et al. Biosensors & Bioelectronics 13(1998) 971]. Zur Stimulation werden Frequenzen zwischen 0,7 und 50 kHz mit Biasspannungen von 12 – 16 μV appliziert. Die Elektroden werden seriell im ein-oder ausgeschalteten Zustand betrieben.

Ein Verfahren und Vorrichtung zur Anreicherung und Aufreinigung von Molekülen an großflächigen Elektroden wird von PCT/DE 97/01368 beschrieben. Dabei werden nur geringe Feldstärken erzeugt und keinerlei Detektionsverfahren einbezogen.

Die Modifizierung und Belegung der Oberflächen mit Biomolekülen, wie sie für das elektrische Sensorarray benutzt werden, wird durch kovalente Bindung oder Adhäsion an die metallischen oder nichtmetallischen Oberflächen oder an die Wandungen von

Kompartments erreicht. Die Moleküle werden dabei als Monolayer oder Multilayer durch kovalente Anbindung, durch Adsorption, durch Einlagerung in Polymere oder als adhäsive Filme aufgebracht [C.F. Mandenius et al., Methods in Enzymology 137(1988)388]. Weit verbreitet ist die Haftschrifterzeugung auf Oberflächen mit funktionalisierten Silanen als Monoschrichten [C. M. Fischer et al., Europhysics Letters 28 (2) (1994) 129 – 134] über gasförmig oder in flüssiger Phase aufgebrachte quervernetzten Schichten [R.A. Williams et al. Biosensors & Bioelectronics 9(1994) 159]. An diese Silanderivate, die Amino-, Thiol-, Aldehyd-, Hydroxyl-, Carboxyl- oder andere funktionelle Gruppen tragen können, werden meist mit Hilfe von Crosslinking-Techniken [H.G. Bäumert and H. Fasold, Methods in Enzymology, Vol. 172, p. 584] verschiedenste andere Verbindungen mit passenden reaktiven Gruppen kovalent gebunden. Auf diese Weise sind alle als affinitätsbindende Fängermoleküle geeigneten bioaktiven Substanzen wie Oligonukleotide, Peptide, Haptene und andere auf den Elektrodenflächen zu immobilisieren.

Eine spezifisch die Metalloberflächen nutzende Immobilisierung ist die Ausbildung von Self-assembling-monoschrichten durch Thiol/Golddbindungen. Nach Ausbildung der Self-assembling-monoschrucht wird z.B. über Streptavidin/Biotin-Kopplungen die geordnete Anbindung von Proteinen wie Antikörpern erreicht [J. Spinke et al., Langmuir 9 (1993) 1821]. In einem anderen Ansatz werden auf Goldflächen über Chelator-thioalkane, histidinmarkierte Proteine geordnet an die Oberflächen gebunden [D. Kröger et al., Biosensors und Bioelectronics 14 (1999) 155].

Eine weitere Methode zur selektiven Aufbringung organischer Haft- und Kopplungsschrichten ist die Elektropolymersation, beispielsweise für die Bindung von Ferrocenen auf Platinelektroden [G.N. Kamau et al. in Anal. Chem. 66(1994)994].

Für die Herstellung biomolekularer Arrays in Mikrodimensionen sind eine Reihe von Verfahren gebräuchlich. Von makroskopischen Auftupfen ist das Aufsetzen miniaturisierter Ringe auf Chipoberflächen abgeleitet, auf die vorher entsprechende Moleküle durch Tauchen aufgebracht wurden [S.D. Rose, J. Ass. Lab.Autom. 3,3(1998) 53].

Das piezoelektrische Drucken, analog den Tintenstrahldruckern, zum Aufbau von DNA-Chips gelang A.P. Blanchard [Genetic Engineering, Principles and Methods, 20(1998)111].

Das sogenannte Mikrokontaktdrucken, d.h. das Übertragen von Molekülen mittels Mikrostampel wurde von A. Kumar und G.M. Whitesides [Appl.Phys.Lett.63(1993)2002] beschrieben.

- 5 Eine mit photolithographischen Masken unterstützte Festphasensynthese auf Chip-Mikroarrealen, die Nucleotidaufbau mittels Photoaktivierung erlaubt, beschreiben G. Mcgall et al. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93(1996) 13555].

- 10 Durch elektrochemische Fokussierung werden nach US 5605662 geladene Moleküle aus der Lösung zu ihren Bindungsplätzen in Gelen über Elektroden transportiert.

Durch perforierte Membranen, die auf Chipoberflächen aufgedrückt werden, sind an den offenen Stellen Immobilisierungsreaktionen an den Oberflächen in flüssiger Phase möglich [E. Ermantraut et al., Proc. of μ TAS'98, Alberta, Can., 1998, p. 217].

- 15 Die aufgezeigten Verfahren stehen für Standardmethoden, die es erlauben, DNA, Oligonukleotide, Proteine und andere Moleküle auf Arraypositionen zu immobilisieren.

- 20 Nachteil aller bisher beschriebenen elektrischen Sensorarray-Anordnungen mit Elektroden als Transducer ist es, daß sie nur zur Monoanalytbestimmung geeignet sind, oder daß **die eigentliche sensorische Funktion** von zusätzlichen optischen Komponenten übernommen werden muß. Die bisher als Array bezeichneten Elektrodensysteme, z.B. Interdigitalelektroden, stellen keine Arrays im eigentlichen Sinn dar, die zur Multianalytmessung geeignet sind. Bisher ist zudem nicht bekannt, wie man
25 Elektrodenarrays mit den in der Computertechnik üblichen seriellen Verfahren, d. h. nacheinander, auslesen kann, ohne daß dabei die elektrische Doppelschicht, die sich durch Polarisation an den Elektroden bei voltammetrischen Detektionsverfahren aufbaut, gestört wird.

- 30 Zur Verbesserung dieser Situation ist also eine Arrayanordnung zur Multianalytmessung notwendig, die eine rein elektrische Sensorfunktionen ermöglicht und die mit elektrischen Steuer- und Meßverfahren ausgeführt werden kann.

- 35 **Aufgabe der Erfindung** ist es, ein Sensorarray für biochemische Affinitätsassays zur Verfügung zu stellen, das mit den Methoden der Halbleitertechnologie gefertigt werden kann und als elektrochemischer Transducer meßtechnisch einfache elektrische Signale direkt in der Position wählbar und ohne optische Komponenten erzeugt. Weiterhin soll ein **Meßverfahren** zur Verfügung gestellt werden, mit dem aus Stoffgemischen

unterschiedliche Analyte gleichzeitig bestimmt werden. Aufgabe ist es weiterhin, ein Verfahren zur seriellen elektrischen Auslesung des Sensorarrays zur Verfügung zu stellen, das Störungen des elektrischen Meßprozesses vermeidet und technologisch kompatibel zu den Methoden der Computertechnologie ist. Es sollen Miniaturisierungs-,
5 Fertigungs- und Handhabungsvorteile realisiert sowie die verbesserte analytische Handhabung molekularbiologischer Assays aufgezeigt werden.

Die Erfindung bezieht sich zum einen darauf, daß als **sensorisches Element** eine Vielzahl von Ultramikroelektroden, d.h. vorzugsweise Elektroden mit typischen
10 Strukturdimensionen unter $1\mu\text{m}$ verwendet und als Arrays auf einem Träger angeordnet werden. Die Anordnung der Ultramikroelektroden im jeweiligen Array zielt neben der Miniaturisierung auf ein vorteilhaftes Diffusionsverhalten der zu detektierenden Moleküle und weiterhin auf die Nutzung voltametrischer und impedimetrischer Detektionsverfahren, wie Redox-Recycling und markerfreie Impedanzmessungen, für die derartige Elektroden
15 Voraussetzung sind.

Die Erfindung bezieht sich ferner auf ein spezielles **serielles Adressierungsverfahren** (für Auslesung oder Transport) der elektrochemischen Prozesse an den Sensorpositionen (Arrays). Die erfindungsgemäße Ultramikroelektrodenanordnung
20 bezieht sich gleichermaßen auf die Erzeugung multipler elektrischer Felder mit sehr hohen Feldstärken, die zum aktiven Transport von Molekülen individuell an allen Sensorpositionen geeignet sind.

Diese Aufgabe wird insbesondere auch gelöst durch ein elektrisches Sensorarray für die
25 Multianalyt-Messung biochemischer molekularer Assays, welches folgendes umfaßt:

- (a) ein mechanisch stabiles planares Substrat, auf dem als Array mehrere Sensorpositionen, die jeweils aus lokal separierten, mindestens paarweisen Ultramikroelektroden und wahlweise zusätzlichen Hilfselektroden bestehen,
- (b) isolierten Leitungen, die eine individuelle elektrische Adressierung jeder
30 Sensorposition und Einzelelektrode gestatten,
- (c) zusätzlichen elektrischen Leitungen, die eine elektrochemische Kontrolle und Steuerung an jeder Position ermöglichen, und wahlweise elektrische Gleich- und/oder Wechselfelder an jeder Sensorposition ermöglichen,
- (d) die Immobilisierung unterschiedlicher oder gleicher affinitätsbindender Moleküle, die
35 entweder auf allen oder ausgewählten Oberflächen der einzelnen Sensorpositionen direkt oder an partikulären Trägern oder gelartigen Substanzen gebunden oder eingeschlossen sind und die individuell über den einzelnen Sensorpositionen angeordnet werden,

- (e) integrierte elektronische Funktionselemente, die die individuelle Kontrolle elektrochemischer Reaktionen an den einzelnen Sensorpositionen und unabhängig davon die individuelle elektrische Messung dieser Reaktionen an jeder Position gestatten, wobei die elektronischen Schaltelemente Gruppen, Reihen oder Einzelpositionen der Sensorarrays zugeordnet sind.

Die Erfindung ermöglicht durch aktive Schaltelemente, bevorzugt im Substrat, eine serielle, d.h. nacheinander erfolgende, elektrische Auslesung der elektrochemischen Prozesse an einzelnen Sensorpositionen. Die aktiven Schalt-, Steuer- und Auslesefunktionen an jeder Sensorposition werden so ausgeführt, daß eine elektrische Doppelschicht, die sich bei elektrochemischen Prozessen an den Mikroelektroden ausbildet, nicht gestört wird.

Intelligente elektronische Funktionselemente als separate Bauelemente oder direkt an den einzelnen Sensorpositionen (Anspruch 7) ermöglichen es außerdem, elektrochemische Prozesse bei einer Sensorposition in den Zeiten zwischen den Adressierungen zum Auslesen aufzuzeichnen und damit zwischenzuspeichern.

Mit der Erfindung wird ein elektrisches Sensorarray zur Verfügung gestellt, das durch die variable Anzahl spezifischer Sensorpositionen für unterschiedliche Analyte erlaubt, unterschiedliche analytische Fragestellungen zu lösen. Darüber wird erfindungsgemäß ein Verfahren aufgezeigt, das es ermöglicht, mit den zur Detektion verwendeten Elektroden partikeltolerant, d.h. unabhängig von optischen Eigenschaften in Sub- μ l-Volumina pro Sensorposition zu messen.

Von Vorteil ist weiterhin die Herstellung des Sensorelements mit waferorientierten Technologien der Halbleiterindustrie, die auch kompatibel zu den Verfahren für die Immobilisierung bzw. Beladung von biochemischen affinitätsbindenden Erkennungsmolekülen auf den Arraypositionen sind.

Eine besondere erfindungsgemäße Variabilität der Anordnungen und Verfahren wird auch durch die folgenden Maßnahmen erreicht:

- Bei weniger als ca. 50 elektrische Sensorpositionen im Sensorarray werden die Ultramikroelektroden durch direkte Leiterbahnen unter einer Isolationsschicht zu (frei liegenden) Kontaktflächen geleitet. Als planare Substrate finden für diese Applikation Silizium, Glas, Keramik oder Polymere vorteilhafte Verwendung.

- Sowohl geringe als auch große Zahlen von Sensorpositionen pro Sensorarray werden durch Integration der Leitungen mittels Si-Chip-Technologie realisiert. Silizium als planares Trägerelement wird insbesondere auch dann verwendet, wenn eine größtmögliche dichte Anordnung von einzelnen Sensorelementen bzw. Positionen erreicht werden soll.
- Als Träger für das Sensorarray wird Silizium auch verwendet, weil es die Anwendung einer effizienten Technologie gestattet und insbesondere dann sinnvoll ist, wenn zur individuellen Kontrolle der Sensorpositionen des Sensorarrays Steuerung und Schaltung sowie Auslesung der einzelnen Sensorpositionen zusätzliche elektronische Elemente wie Transistoren, Dioden, Widerstände und andere übliche elektronische Komponenten positionsbezogen im Träger integriert werden.
- Sowohl bei den elektrischen Sensorpositionen mit direkter Kontaktierung als auch bei jenen mit integrierten elektronischen Elementen an den individuellen Sensorpositionen wird erfindungsgemäß ein neues Verfahren zur unabhängigen Kontrolle und seriellen elektrochemischen Detektion an den Sensorpositionen benutzt. Für die elektrochemische Detektion werden dazu durch Elektrodenpolarisation erzeugte elektrische Doppelschichten an den Elektrodenoberflächen kontinuierlich an alle Sensorpositionen appliziert. Erreicht wird dies durch Umschalter, die verhindern, daß durch serielle, d. h. im zeitlichen Abstand nacheinander erfolgende elektrische Auslesungen der einzelnen Sensorpositionen, diese Polarisation gestört wird und keine sogenannten Umladungsprozesse auftreten.
- Ein besonderer Nutzen entsteht dadurch, daß die zur Detektion verwendeten Ultramikroelektroden wahlweise ergänzt um weitere Hilfselektroden, gleichzeitig sowohl als Elemente zur Ausführung elektrophoretischer Transportvorgänge der Analytmoleküle zu den Orten affinitätsbindender Partnermoleküle als auch zur Beseitigung unerwünschter Bindungsereignisse eingesetzt werden.

Das Vermeiden der Störung der Polarisation wird durch die Anordnung zur elektrischen Kontrolle erreicht, die die nicht mehr adressierten Arrays mit einer Polarisationsspannung kontinuierlich weiterhin versorgt (Anspruch 6). Die Weiterversorgung dauert bis zum nächsten Zeitpunkt der Adressierung, zu dem eine Information der Sensorposition erneut abgefragt wird. Die elektrische Kontrolle in den Nicht-Adressierungszeiten ist in der Lage, einen Stromfluß bereitzustellen, bevorzugt durch eine im wesentlichen galvanische oder

ohmsche Verbindung von einem jeweiligen Array zu der das Potential liefernden Quelle, insbesondere fernab von der Sensorposition (Anspruch 36,37).

Es sind drei Qualitäten von Leitungsführungen vorgesehen. Eine Leitungsführung dient der Adressierung, also der Auswahl eines Arrays, einer Spalte oder einer Zeile von Arrays (Anspruch 5). Eine weitere Leitungsführung dient der Übertragung von Signalen (Strom, Spannung, Potential oder solche Verläufe) mit Bezug auf eine jeweils individuelle Sensorposition. Eine dritte Leitungsführung dient der Bereitstellung der beschriebenen Polarisationsspannung bzw. solcher Potentiale, zum Anlegen an die gerade nicht adressierten (d.h. gerade nicht gelesenen) Arrays.

Bevorzugt können die Leitungsführungen zum Auslesen und zum Bereitstellen der Polarisationsspannung (Erhaltungsspannung) parallel und mit dem Träger gekoppelt verlaufen. Ebenfalls bevorzugt verläuft die Leitungsführung zur Adressierung senkrecht dazu (Anspruch 35).

Die Leitungsführungen können, mit Ausnahme der "weiteren Leitungen" auch außerhalb des Trägers vorgesehen sein.

Die Umschalter (Anspruch 39, Anspruch 42) sorgen für ein Verändern der Zuordnung der Elektroden zu entweder der einen oder der anderen Leitungsführung, abhängig vom Zustand der Adressierung. Ein Zustand, bei dem die Anschlüsse der Elektroden "nicht angeschlossen sind" (not connected oder n.c.), existiert nicht. Es ergeben sich kontrollierte und störungsfreie Umschaltungen von Meß- zu Erhaltungspotential bzw. eine zwischenzeitliche Erfassung und Speicherung der Vorgänge, die durch den Adressiervorgang erkannt werden können (Anspruch 8). Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit einer zwischenzeitlichen Erfassung, um während der nicht adressierten Perioden keine Zeit nutzlos verstreichen lassen zu müssen. Durch die elektrische Kontrolle und die Erhaltungspotentiale kann der Prozeß ständig weiterlaufen und auch die zwischen zwei Erfassungen liegende Zeit aktiv genutzt werden.

Beschreibung der Zeichnungen und der Ausführungsbeispiele.

Figuren 1 zeigen ein Array mit interdigitalen Ultramikroelektroden mit paarweisen Mikroelektroden und Details einzelner Sensorpositionen.

Figuren 2 zeigen Anordnungen und Kombinationen verschiedener Formen von Ultramikroelektroden und Hilfselektroden einer einzelnen Arrayposition.

Figur 3 zeigt ein Schema eines Arrays von Paaren interdigitaler Ultramikroelektroden mit aktiven CMOS-Schaltlementen zur Addressierung und Kontrolle der individuellen Elektrodenpolarisation sowie externen Lese- und Meßverstärkern.

Figur 3a ist eine Ausschnittsvergrößerung einer Sensorposition aus der Figur 3, wobei sämtliche mögliche Schaltpfade zu den beiden Ultramikroelektroden gezeigt sind, hier aber der Schaltpfad über den Schalter 12 (integrierte Schaltung im adressierten Zustand) durchgeschaltet ist. Der gestrichelt gezeichnete Schaltpfad 13 ist nicht durchgeschaltet, also gesperrt.

Figur 4 zeigt ein Schema eines Arrays von Paaren interdigitaler Ultramikroelektroden mit aktiven CMOS-Schaltlementen zur Addressierung und Kontrolle der individuellen Elektrodenpolarisation, mit Kontrollverstärker, Lese- und Steuereinrichtungen 22,23 an jeder Sensorposition sowie externen Lese- und Meßverstärkern.

Figur 5 zeigt ein Schema der Anordnung von Arrayelektroden und integrierten-CMOS-Elementen.

Figur 6 veranschaulicht die Ansteuerung eines Elektrodenarrays gemäß Figuren 1, wobei die Schalter 12 und 13 schematisch eingezeichnet sind, angesteuert über einen Multiplexer 10 (1 aus n-Dekoder). Ersichtlich ist, daß diejenigen Meßzellen (hier mit WE1, WE2, WE3 bezeichnet), die nicht zum Auslesen aktiviert ist, mit den Schaltelementen 13, die ebenso aufgebaut sein können, wie aus Figur 3, 4 und 5 ersichtlich, an einen Ruhepotential gelegt sind. Das Schaltelement WE1 ist aktuell adressiert dargestellt, durch einen Schaltzustand 12, entsprechend dem Schalter 12 der Figur 3 und seines Schaltpfades.

Figur 7 zeigt eine voltammetrische Meßschaltung mit Elektrodenarrays zum Redox-Recycling entsprechend dem später erläuterten Anwendungsbeispiel 10, zur Ansteuerung des Arrays nach Figuren 1 oder Figur 3.

Figur 8 veranschaulicht die integrierten Schalter 12, 13, der Figuren 3 und 4 in einer schematischen Darstellung mit mehreren CMOS-Schaltern, die über die Adressenleitungen 14 ansteuerbar sind.

Figur 8a veranschaulicht das in Figur 3a hervorgehobenen Beispiel aus der Figur 3 mit CMOS-Schaltern (als Transmission Gates) entsprechend Figur 8.

Figur 9 zeigt Meßkurven des elektrochemischen Redox-Recycling von p-Aminophenol, die entsprechend dem Anwendungsbeispiel 16 erhalten werden. Jede der eingezeichneten Langzeit-Kurven K1 bis K8 besteht aus mehreren Meßpunkten, hier interpoliert und von einem Meßrauschen überlagert dargestellt. Die Meßzeit pro Punkt beträgt zwischen 20 msec und 100 msec.

Einige Bezugszeichen aus den Figuren.

1	planarer Träger
1s	Siliziumsubstrat
5 2	Kontaktflächen
3a	ringförmiges Ultramikroelektrodensystem
3a'	ringförmiges Ultramikroelektrodensystem
3b	Hilfselektrode
3c	Hilfselektrode
10 3, 3'	interdigitales Ultramikroelektrodenpaar
3d, 3d'	Interdigitalelektrodenpaar
3e, 3e'	Hilfselektrodenpaar
3f, 3f'	Ultramikroelektrodenarray
3g, 3g'	Interdigitalelektrodenpaar mit Ultramikroelektrodenarray
15 3h, 3h'	Elektrodenpaar mit Ultramikroelektrodenarrays
3i, 3i'	mäanderförmige Ultramikroelektroden
3j	Hilfselektrode
4	Areale der Sensorpositionen
5	Abdeckung der Elektrodenzuleitungen und Steuerleitungen
20 6, 6'	Metallische Leitungsbahnen zu den Elektroden 3, 3'
6''	Metallische Leiterbahnen zu den Hilfselektroden
7	Siliziumdioxid
8	Kompartimentmaterial
9	punktförmige Ultramikroelektroden
15 10	elektronische Vorrichtung zur Adressierung und Dekodierung
11	elektronische Einrichtung mit Leseverstärkern
12, 12'	integrierte Schaltung im adressierten Zustand
12a, 12a'	Durchkontaktierung
13, 13'	integrierte Schaltung im nicht adressierten Zustand
10 13a, 13a'	Durchkontaktierung
14	aktive Adreßleitung A
15	aktive Adreßleitung A'
16	inaktive Adreßleitungen B
17	inaktive Adreßleitungen B'
15 18	Meßleitung Signal C
19	Meßleitung Signal D
20	Bias-Leitung Signal E
21	Bias-Leitung Signal F

	22, 22'	adressierte integrierte Lese-, Verstärker- und Speicherelektronik
	23, 23'	nicht adressierte integrierte Lese-, Verstärker- und Speicherelektronik
	24	CMOS-Wanne
	25	Source
5	26	Drain
	27	CMOS-Aluminium
	28	CMOS-Dielektrikum
	29	flüssigkeitsresistente Passivierung
	30	Goldelektrode
10	31	Polysilizium-Gate
	31a	Polisilizium-Leiterbahn
	32	Kreuzung von Adreßleitung und Meßleitung
	33	Kapazitätskompensierter Schalter (Fig. 8)

In **Figur 1a** ist ein Siliziumchip dargestellt, bei dem auf jeder Arrayposition 4 (Sensorposition) jeweils 1 Paar ringförmiger Mikroelektroden 3a und 3a' angeordnet sind, die durch direkte Leiterbahnen zu elektrischen Verbindungskontaktflächen 2 am Rande des Chips verlaufen. In **Figur 1b** ist eine Detailvergrößerung des Chips des Arrayelementes aus **Figur 1a** im Ausschnitt PP' dargestellt. Von jeder Arrayposition 4 werden die Ringelektroden 3a und 3a' zu jeweils einer individuellen Kontaktfläche 2 am Rande des Chips über die Leitungen 6 geführt. Die Leiterbahnen 6 sind dabei von einer flüssigkeitsdichten Isolationsschicht 5 bedeckt. Ein Querschnitt dieser Abbildung entlang der Schnitlinie I-I ist in **Figuren 1c und 1d** dargestellt. Auf dem Silizium-Substrat 1 ist eine isolierende Schicht aus Siliziumdioxid 2 aufgebracht, die die Elektroden 3a und 3a' sowie die Leiterbahnen 6 als Dünnschichtmetallstrukturen trägt. Durch die isolierende Abdeckung 5 werden die Leiterbahnen 6 bedeckt, während die aktiven Elektroden 3a und 3a' in den Arraypositionen 4 frei bleiben. Die Abdeckung 5 dient auch zur Abgrenzung zwischen den Elektroden der einzelnen Arraypositionen. In **Figur 1d** ist der Querschnitt I-I dargestellt, mit einer zusätzlichen dickeren Polymerschicht 8, die zur Ausbildung von Mikrokompartments (Kompartiments) oder Distanzringen an den Arraypositionen mit den Ringelektroden 3a und 3a' dienen.

In den **Figuren 2** sind einzelne Arraypositionen 4 mit verschiedenen Anordnungen der Ultramikroelektroden und Hilfelektroden dargestellt. **Figur 2a** zeigt im Detail ein Paar ringförmige Ultramikroelektroden 3a und 3a' mit den Verbindungsleitungen 6 auf einer Arrayposition 4 entsprechend **Figur 1a**. In **Figur 2b** sind ringförmige Bandelektroden 3a und 3a' sowie 3c angeordnet und zusätzlich eine zentrale kreisförmige Hilfelektrode 3b im Zentrum dieser Bandelektroden. **Figur 2c** zeigt im Detail ein Paar Ultramikroelektroden 3 und 3' mit den Ableitungen 6, 6' auf der Arrayposition. **Figur 2d** zeigt 2 Paare interdigitaler Ultramikroelektroden unterschiedlicher Geometrie mit schmalen Elektrodenstrukturen 3 und 3' und vergrößerten Strukturen 3d und 3d' mit individuellen Verbindungsleitungen 6. In **Figur 2e** ist ein interdigitales Ultramikroelektrodenpaar 3 und 3' mit zwei metallischen Hilfelektroden 3e und 3e' angeordnet; die Verbindungsleitungen der Hilfelektroden sind 6". **Figur 2f** zeigt ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden 3 und 3' und zwei flächige Hilfelektroden 3f und 3f', die von der isolierenden Schicht 5 bedeckt sind. In dieser Abdeckung 5 sind punktförmig aktive Elektrodenflächen 9 freigelegt, die parallel geschaltet sind. In **Figur 2g** ist ein interdigitales Elektrodenpaar 3g und 3g' mit analogem Aufbau wie die Hilfelektroden 3f und 3f' dargestellt. Die punktförmigen Elektroden 9 sind entsprechend der Fingerstruktur elektrisch miteinander verbunden. **Figur 2h** zeigt ein Paar flächiger Elektroden 3h und 3h', die ebenfalls von einer Abdeckschicht 5 bedeckt sind, und Öffnungen mit aktiven

punktförmigen Elektroden 9 aufweisen. In Figur 2i ist ein mäanderförmiges Elektrodenpaar 3i und 3i' mit einer flächigen (W-förmigen) Hilfselektrode 3j kombiniert.

Die obigen Darstellungen in allen Figuren 2 (die Figuren 2a bis Figur 2i) sind der Vereinfachung halber funktionell beziffert. Jeweilige Verbindungsleitungen, die zu den Hauptelektroden 3, 3' führen, sind mit 6, 6' bezeichnet, unabhängig davon, welche jeweilige geometrische Struktur die Hauptelektroden besitzen. Die Verbindungsleitungen zu den Hilfselektroden sind mit 6" bezeichnet, auch unabhängig davon, wie die Geometrie und die Gestaltung der Hilfselektroden jeweils ist. Für die folgende Beschreibung wird von Hauptelektroden 3, 3' ausgegangen und die Verbindungsleitungen ebenfalls funktionell jeweils mit 6, 6' bezeichnet, auch wenn an verschiedenen Arraypositionen unterschiedliche Verbindungsleitungen vorhanden sind. Funktionell gedacht sind bei einer Vielzahl gleichgestalteter Arraypositionen (Sensorpositionen) praktisch alle Arraypositionen gleich, nur unterschiedlich auf dem Substrat 1 platziert, so daß es für das Gesamtverständnis als hilfreich angesehen wird, wenn funktionell gleiche Elemente auch mit denselben Bezugszeichen durchgängig bezeichnet werden. Gleiches gilt für die weiter unten erläuterten CMOS-Schalter 12, 13, die mit ihrem Schaltzustand beziffert werden.

In Figur 3 ist ein Array mit Paaren von interdigitalen Ultramikroelektroden 3,3' gezeigt, wo Adressierung und Steuerung der Elektrodenpolarisation durch CMOS-Schalter 12, 12' und 13, 13' im Siliziumchip 1 an jedem einzelnen Interdigitalsystem 3 und 3' (Sensorposition 4) angeordnet sind. Die flüssigkeitsdichte Abdeckung 7 liegt über dieser Schalterebene. Die Leitungen 6,6' in der Ebene der Ultramikroelektroden führen an den Stellen 12a, 12a' und 13a, 13a' durch Öffnungen in der isolierenden Abdeckschicht 7 (Figur 1) zu der tiefer liegenden Ebene der CMOS-Schalter.

Von einer auf dem Silizium-Chip angeordneten elektronischen Adressiereinheit 10 werden die Adreßleitungen 14 und 15 bzw. 16 und 17 angesteuert.

Die Schalter 12, 12' zeigen einen aktivierten Schaltzustand beim Auslesen einer Spalte von Ultramikroelektroden-Paaren. Die adressierten Ultramikroelektroden sind mit den Meßleitungen 18, 19 verbunden. Die Leitungen 18, 19 führen zu einem Leseverstärker 11. Die Schalter 13, 13' sind in Ruhestellung, die nicht adressierten Ultramikroelektroden sind mit Bias-Leitungen 20, 21 verbunden.

Die oben beschriebenen Meßleitungen, Bias-Leitungen und Adreßleitungen sind mit Signalen belegt, die zu unterschiedlichen Zeiten aktiv sind. Die Adreßsignale A, A' sind

das Aktivierungssignal für die linke (vertikale) Spalte der Sensorpositionen 4, hier die Sensorpositionen 100 und 110. Das Adresssignal A aktiviert den Schalter 12, der die Elektrode 3 über die Leitung 6 und die Durchkontaktierung 12a an die Meßleitung 18 koppelt. Das Adresssignal A' aktiviert den Schalter 12', der die gegenüberliegende Elektrode 3' über die gegenüberliegende Leitung 6', die gegenüberliegende Durchkontaktierung 12a' an die zweite Meßleitung 19 legt. An den Meßleitungen 18, 19 entsteht das Meßsignal C, D, das von dem Meßverstärker 11 empfangen, gespeichert und/oder ausgewertet werden kann. In gleicher Weise arbeiten die nicht aktivierten Spalten von Sensorpositionen 101, 111 und 102, 112, die in der Mitte und rechts in Figur 3 gezeigt sind. Am Beispiel soll die mittlere, obere Sensorposition 101 beschrieben werden, bei der das Adresssignal B den Schalter 13 so einschaltet, daß die Elektrode 3 über die Leitung 6, die Durchkontaktierung 13a auf das Biaspotential E der Leitung 21 geschaltet wird. Der zu der Durchkontaktierung 13a führende Schalter 12 ist deaktiviert, so daß keine Meßsignale von dieser, in deaktiviertem Zustand befindlichen Arrayposition erhalten werden. Auf der gegenüberliegenden Seite, bei der Elektrode 3', die über die Leitung 6', die Durchkontaktierung 13a' und den Schalter 13' an die Biasleitung 20 mit Potential F gelegt wird, geschieht dasselbe. Auch hier ist der zugehörige Schalter 12' deaktiviert. Die nicht adressierten Sensorpositionen werden also über die Schalter 13, 13' mit den Biasleitungen 20, 21 verbunden, so daß die Elektroden 3, 3' nicht einem beliebigen Potential überlassen sind, sondern einem von außen fest vorgegebenen Potential.

Für die Figur 3 und auch für die weiter unten beschriebene Figur 4 ist folgendes zu berücksichtigen. Zur Veranschaulichung des eingeschalteten Zustandes zum Messen (Leitungen 18, 19 mit Signalpotentialen C, D) und der "abgeschalteten Zustände" (Bias-Leitungen 20, 21, mit Signalen E, F) ist eine jeweilige Sensorposition 4 nur so eingezeichnet, daß ihr aktueller Schaltzustand der Schalter 12, 12' bzw. 13, 13' verdeutlicht ist. Auf dem ganzen Chip ist aber jede Sensorposition so ausgestaltet, wie eine überlagerte Fassung des linken oberen und mittleren oberen Sensorarrays, besitzt also zwei Schalter 12, 12' zum Schalten einer und derselben Sensorposition 4 auf die Meßleitung 18, 19 und zwei Schalter 13, 13' zum Schalten derselben Durchgangsstellen 12a, 12a' auf die Bias-Leitungen 20, 21 bei abgeschalteten unteren Schaltern 12, 12'. Nur einer dieser Schalterpaare ist jeweils aktiv, so wie in Figur 3 für unterschiedliche Sensorpositionen 4 eingezeichnet. Mit anderen Worten werden die Interdigitelektroden 3, 3' mit den unteren beiden Schaltern 12, 12' an die Meßleitungen 18, 19 gelegt, von denen mehrere beabstandet parallel verlaufen, für jede Reihe von Interdigitelektroden. Dabei werden die Schalter 12 und die Schalter 12' in einer vertikalen Reihe über die Adreßleitungen 14, 15 bzw. die Adreßsignale A, A'

eingeschaltet. Gleichzeitig sind die Adreßleitungen B, B' für die anderen Interdigital-Spalten auch vorhanden, nur haben sie einen anderen Schaltzustand, so daß die zu denselben, gerade beschriebenen Interdigitalelektroden gehörenden Schalter 13, 13' eingeschaltet sind. Bei einem Wechsel, also bei einem Abschalten der zur Messung führenden Schalter 12, 12' schalten die zur Bias-Leitung 20, 21 führenden Schalter 13, 13' ein und sorgen dafür, daß eine kontrollierte und störungsfreie Umschaltung von Meß- zu Erhaltungspotential stattfindet. So lange, wie das Erhaltungspotential der Leitung 20, 21 an den Elektrodenpaaren 3, 3' anliegt, und das sind all diejenigen Elektrodenpaaren, die nicht in einer gerade adressierten vertikalen Spalte liegen, findet keine Störung der Polarisation statt und es finden keine Umladungsprozesse statt. Das erlaubt eine zwischenzeitliche Erfassung während des nicht ausgelesenen (zum Auslesen adressierten) Zustandes, so daß während des nicht ausgelesenen Zustandes keine nutzlose Zeit verstreicht, die nicht zur Erfassung eines Signals dient. Das Signal wird vielmehr auch hier erfaßt und in gemäß Figur 4 beschriebenen Schaltungen 23, 23' gespeichert, um es später, bei einem nächsten Adressiervorgang auslesen zu können.

In Figur 4 ist ein Sensor-Array mit Paaren von interdigitalen Ultramikroelektroden gezeigt, das der Anordnung nach Figur 3 entspricht. Die oval umrandeten Bereiche 22, 22' und 23, 23' sind elektronische Schaltungen mit Integratoren als Meßwertspeichern, welche die Stromwerte der benachbarten Ultramikroelektroden 3, 3' speichern. In den Gebieten 23, 23' wird über die Adreßleitungen 16, 17 das Signal zur Durchführung einer Integration angelegt und die Ultramikroelektroden mit den Bias-Leitungen 20, 21 verbunden. In den Bereichen 22, 22' ist durch die Signale der Adreßleitungen 14, 15 die Ausgangsspannung eines Integrators an die Meßleitungen 18, 19 gelegt.

In Figur 5 ist in Silizium 1s als planarem Träger eine CMOS-Wanne 24 mit Source 25 und Drain 26 integriert. Ein Gate und Leiterbahnen aus Polysilizium 31 verbinden zusammen mit CMOS-Aluminium 27 im CMOS-Dielektrikum 28 die chip-internen Elemente. Ebenfalls mittels Aluminium ist die Source 25 mit der Goldelektrode 30 durch eine flüssigkeitsdichte Siliziumnitrid-Passivierung 29 hindurch elektrisch verbunden. In einem Kreuzungsbereich 32 kreuzen sich z.B. Leiterbahnen wie die Adreßleitung 15 mit der Meßleitung 18 gemäß Figur 4.

Bevorzugte Anordnungen

Für die Konstruktion des elektrischen Sensorarrays werden planare Träger bzw. Substrate aus verschiedenen Materialien verwendet. Ein besonders günstiges Material ist Silizium, weil mit den eingeführten technologischen Methoden der Halbleiterfertigung die

erfindungsgemäßen Ultramikroelektrodenarrays in Dünnschichttechnologie und in Waferprozessen hergestellt werden können. Diese Methode ist variabel und preisgünstig, wenn Arraypositionen mit geringer Dichte, d. h. ca. 10 – 30 Arraypositionen pro elektrisches Sensorarray hergestellt werden sollen, so daß wie in Figuren 1 dargestellt, die Ultramikroelektroden über isoliert verlaufende direkte Kontaktierungen mit Kontaktflächen am Rand des Chips verbunden werden.

Wenn zur Ansteuerung individueller Positionen des Sensorarrays für eine Steuerung und Schaltung sowie Auslesung der einzelnen Positionen zusätzliche elektronische Elemente wie Transistoren, Dioden, Widerstände und Kondensatoren integriert werden, wie in Figuren 3 und 4 dargestellt, ist die Siliziumtechnologie sehr günstig. Silizium als planares Trägerelement wird insbesondere auch dann verwendet, wenn mehr als ca. 60 Arraypositionen pro Sensorelement oder eine sehr dichte Anordnung dieser Positionen erreicht werden soll.

Bei direkter elektrischer Kontaktierung ist die Verwendung von Glas und glasähnlichen Substanzen sowie Keramik und auch den besonders verschiedenen Arten von Polymeren als planarer Träger möglich. Alle Substrate müssen dabei die Eigenschaft aufweisen, daß metallische Leiterbahnen und die strukturierten Ultramikroelektroden auf ihnen haftfest aufgebracht werden können. Das halbleitende Silizium wird durch dünne Schichten aus Siliziumdioxid oder Siliziumnitrid oder deren Gemische isoliert. Auf den Einzelpositionen des elektrischen Sensorelements werden die Ultramikroelektroden und bedarfsweise Hilfselektroden oder Hilfsflächen aus Metallen durch Aufdampfen oder Aufputzen von Edelmetallfilmen wie Gold, Platin oder Iridium aufgebracht und üblicherweise durch photolithographische Prozesse und/oder Naß- bzw. Trockenätzen strukturiert. Mit Hilfe dünner Haftsichten aus Chrom oder Titan oder Tantal oder anderen ähnlichen Metallen wird die Haftung dieser Edelmetalle zum planaren Substrat verbessert. In besonderen Ausführungsformen werden nm-strukturierte Ultramikroelektroden in die Isolatorschichten eingelegt und damit zum Zwecke hoher Chipausbeuten und Kurzschlußfestigkeit planarisiert.

Die für die Detektion verwendeten Ultramikroelektroden, gemäß Figuren 2 sind mindestens paarweise angeordnet und können als interdigitale Ringstrukturen 3a, 3a', 3b, 3c, als interdigitale Strukturen verschiedener Geometrien 3, 3', 3d, 3d' 3g, 3g' in einfacher oder mehrfacher Ausführung oder auch als Mäander 3i, 3i' angeordnet sein. Sie können zusammen mit Flächen diskförmiger Ultramikroelektroden sowie auch zusammen mit Hilfselektroden in verschiedensten Kombinationen benutzt werden.

Die bandförmigen Elektrodenstrukturen, die paarweise als kreis- oder spiralförmige oder interdigitale oder mäandrische Anordnungen ausgeführt sind, werden bevorzugt für das Redox-Recycling als Detektionsverfahren benutzt und photolithografisch in Dimensionen zwischen 200 nm und 800 nm gefertigt, sind aber prinzipiell auch sowohl in größeren als
5 auch in kleineren Dimensionen geeignet.

Analoge Elektrodenstrukturen unter 500 nm Strukturbreiten, bevorzugt zwischen 100 und 300 nm, werden zur markerfreien Detektion der Affinitätsbindung großer Moleküle an die elektrodengebundenen Fängermoleküle mittels Impedanzspektroskopie gefertigt.
10

Eine besondere Eigenschaft der bandförmigen paarweisen Ultramikroelektrodenstrukturen und auch der in großer Nähe angeordneten zusätzlichen Elektroden ist die Erzeugung hoher elektrischer Felder mit Feldstärken bis zu mehreren Megavolt pro m mit relativ geringen Spannungen von typischerweise 0,5 bis 20 V. Die elektrischen Felder
15 zwischen sub- μ m-Elektroden verlaufen nur in aller nächster Nähe der Elektroden und durchdringen damit bevorzugt die aufliegenden Molekülschichten, erfassen aber vergleichsweise wenig von der umgebenden Elektrolytlösung.

Dies wiederum gestattet, einen elektrophoretischen Transport von Molekülen schon mit
20 Spannungen von wenigen Volt und damit einem erheblich niedrigeren Spannungsbedarf als bei den sog. Makroelektroden mit Abmessungen typischerweise über 10 μ m zu realisieren. Auch durch höhere Spannungen hervorgerufene störende Vorgänge wie Elektrolyse, pH-Gradientenerzeugung u.a. werden auf diese Weise reduziert oder verhindert.

Bei mehrfacher Anordnung paarweiser Ultramikroelektroden, wie in Figur 2b gezeigt, ist eine wahlweise Felderzeugung zwischen den verschiedenen Elektroden möglich. Auch die Möglichkeit von Differenz- oder Brückenschaltungen bei der elektrochemischen Detektion ergibt meßtechnische Vorteile zur Kompensation von Störungen. So sind die in
30 Figur 2d dargestellten zwei Paare interdigitaler Ultramikroelektroden mit unterschiedlichen Geometrien für Differenzschaltungen auf Grund unterschiedlicher Detektionseigenschaften, wie die Amplifikationsrate beim Redox-recycling, geeignet.

Auch unterschiedliche organische Beladungen erfüllen diesen Zweck einer
35 Differenzmessung. Mittels Abdeckung eines Paares durch galvanische Abscheidung von nicht Self-assembling-monoschichten ausbildenden Metallen, wie z.B. Nickel o.a., wird eine Immobilisierung verhindert. Auch nachträgliche individuelle Entfernung der Immobilisierungsschicht auf einer Elektrode z.B. durch Desorption einer Self-assembling-

Schicht mittels elektrischer Oxidation auf einem dieser Elektrodenpaare kann für solche Differenzmessungen genutzt werden.

Die Erzeugung 1 bis 2 μm großer punktförmiger Ultramikroelektroden 9 auf den in der übrigen Fläche isolierten Arrays, wie in Figuren 2f, 2g und 2h dargestellt, dient optimaler hemisphärischer Diffusion von elektrodenaktiven Partikeln zu den Elektrodenflächen. Diese hemisphärische Diffusion bewirkt an den punktförmigen Elektroden eine mehr als zehnfach höhere Stromdichte pro Fläche sowohl bei der Detektion als auch bei der Applikation von elektrischen Feldern verglichen mit Makroelektroden.

In einer besonderen Ausführungsform können diese punktförmigen Elektroden wie auch die bandförmigen Elektroden gemäß Figuren 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2h und 2i von einer dünnen Isolatorschicht auf einer oder beiden Elektroden eines Paares bedeckt sein und damit ein besonderes Meßelement zur Kapazitätsmessung immobilisierter oder an die Oberfläche anbindender Moleküle darstellen. Gleichermäßen ist durch solche Isolierung eines von zwei Paaren von Ultramikroelektroden eine Differenzmessung möglich.

Die Kombination eines Ultramikroelektrodenpaares mit flächenförmigen Hilfselektroden wie in Figur 2e dargestellt, wird verwendet zur Vergrößerung metallischer Bindungsflächen zur Immobilisierung von Molekülen. Gleichzeitig können diese Flächen wie 3e und 3e', aber auch zur Applikation von elektrischen Zusatzfeldern benutzt werden, um beispielsweise Moleküle in die Nähe der Detektionselektroden 3 und 3' zu transportieren oder bei der Beseitigung von unerwünschten Molekülen Feldunterstützung zu ermöglichen. In Figur 2f ist die Kombination eines interdigitalen Ultramikroelektrodenpaares mit Hilfselektroden 3f, 3f' gezeigt, die mit den beschriebenen punktförmigen Elektroden besetzt sind. Dabei werden die für band- und punktförmige Elektroden vorstehend beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften der Ultramikroelektroden kombiniert.

In einer besonderen Ausführungsform, wie in Figur 2h dargestellt, werden flächenförmige Elektroden mit ultramikroelektrodenförmigen Punkten 9 besonders zur Anwendung für die Impedanzspektroskopie benutzt. Dabei können immobilisierte Moleküle sowohl über den gesamten Elektrodenflächen oder in den Zwischenräumen oder auf den aktiven Elektrodenoberflächen spezifisch gebunden sein. In einer anderen Ausführungsvariante werden die Moleküle auf den vorgenannten dünnen Isolatorschichten über den Elektroden immobilisiert.

Weitere Kombination von Elektrodenformen und damit deren Eigenschaften wie z. B. die Doppelanordnung der Elektrodenpaare 3, 3' oder die Kombination von 3a, 3a' mit 3e, 3e' oder 3e, 3e' mit 3g, 3g' und andere sind dabei möglich.

- 5 Eine besondere Ausführungsform sind die ringförmigen Ultramikroelektroden 3a, 3a' in Figuren 1, 2a und 2b, die im Prinzip analoge Eigenschaften wie die Paare interdigitaler Mikroelektroden 3 und 3' zeigen, aber effektiver die Ausnutzung der Sensorarrayfläche gestatten und die Applikation zentraler 3b und äußerer Hilfselektroden 3c ermöglichen, die für Feldverteilung und Felderzeugung von Bedeutung sind. Mit letzterer Anordnung
10 läßt sich ein käfigähnliches Feld über z.B. zeitweise inaktiven Elektroden 3a, 3a' erzeugen und gezielt Moleküle in diesen Bereich hereinziehen oder abstoßen.

- Die in Figur 2i dargestellten mäanderförmigen Elektroden 3i und 3i' entsprechen in ihren Eigenschaften den ringförmigen- und den interdigitalen Bandelektroden und können
15 ebenso mit den Hilselektroden 3j für Differenzmessungen oder zur Felderzeugung kombiniert werden.

- Eine spezielle, nicht in den Abbildungen dargestellte Form bandförmiger Elektroden ist die spiralförmige Anordnung der Ultramikroelektroden, bei denen parallele
20 Elektrodenbänder von außen nach innen oder von innen nach außen laufen und zu getrennten Kontaktleitungen führen. Auch die spiralförmigen Ultramikroelektroden können wieder mehrfach als Paare mit unterschiedlichen Geometrien kombiniert werden, gegebenenfalls auch mit zusätzlichen Hilfselektroden, entweder flächenförmig oder entsprechend 3b und 3c.

- 25 Sowohl die ringförmigen als auch die kreis- und spiralförmigen Ultramikroelektroden können in Analogie zur Figur 2g mit punktförmigen Ultramikroelektroden zusätzlich strukturiert sein und weisen dann auch analoge Eigenschaften auf.

- 30 Eine besondere Ausführungsform der Ultramikroelektrodenarrays entsteht nach Anspruch 7 dadurch, daß auf den einzelnen Positionen bandförmige Elektroden, wie in Figuren 2a, 2b, 2c, 2d oder 2i, oder flächenförmige Elektroden analog Figur 2e, mehrfach übereinander gestapelt werden und die dann von isolierenden Zwischenschichten wie Siliziumdioxid, Siliziumnitrit, Siliziumoxinitrit voneinander isoliert sind. Dazu wird das
35 Aufdampfen von Metallen und die PECVD-Abscheidung der Isolatorschichten kombiniert. Diese gestapelten Elektroden sind typischerweise 10 – 200 nm dick und bewirken an den Schnittkanten eines solchen Stapels, der von einem Isolationsmaterial bedeckt ist, ein Ultramikroelektrodenverhalten, wo allerhöchste Annäherung der Elektroden und die

Erzeugung ultrahoher Feldstärken erreicht werden. Die einzelnen Schichten werden bei dieser Anordnung unter einer isolierenden Bedeckung seitlich zu Kontaktflächen einzeln und individuell herausgeführt.

- 5 Prinzipiell ist es auch möglich, die in den Figuren 2 gezeigten und vorstehend beschriebenen Ultramikroelektroden und Hilfselektrodenstrukturen mit metallischen Flächen zu kombinieren, die keinen elektrischen Anschluß tragen. Sie dienen dann z.B. als Areale zur Immobilisierung von affinitätsbindenden Molekülen.
- 10 Die Ultramikroelektroden einer einzelnen Arrayposition werden mit metallischen Gesamtflächen von typischerweise 100 – 30 000 μm^2 ausgeführt und gestatten es daher, Arraypositionen mit sehr kleinen Abmessungen zu konstruieren, wobei die Abstände der Arraypositionen typischerweise den Abmessungen der aktiven Elektrodenflächen von 30 μm bis 300 μm entsprechen, aber auch wesentlich größer oder kleiner sein können, wenn
- 15 Applikationen dies erfordern.

Wie in Figur 1d dargestellt, werden für spezielle Anwendungen, dies sind insbesondere quantitative voltametrische Meßverfahren wie das Redox-recycling, die Arraypositionen durch volumenseparierende Mikrokompartimentwände voneinander abgetrennt. Im

20 Falle qualitativer Detektion, wie lokale Impedanzspektroskopie an sensorgebundenen Fängermolekülen ist die Volumenseparierung in der Regel nicht erforderlich.

Volumenkompartimentierte Mikroareale werden auch dann benutzt, wenn Reaktionen und Molekülimmobilisierungen auf individuellen Arraypositionen ausgeführt werden sollen. Falls die Detektion dies erfordert, können diese Kompartments wahlweise nach

25 ausgeführten Immobilisierungsreaktionen wieder entfernt werden. Damit entsteht ein ideal planares Sensorarray, das homogen sowohl für Analyt- als auch Reagenzlösungen zugänglich ist.

30 Mittels Stempel-, Piezo- oder Tintenstrahltechnik oder anderen Spottingverfahren, wie Mikrokapillardosierung können die zu immobilisierenden Moleküle ebenfalls auf den Sensorpositionen ohne Kompartimentierung lokal positioniert werden.

Die zu immobilisierenden Fängermoleküle selbst werden nach bekannten Verfahren über

35 bifunktionelle Reagenzien z.B. Alkyloxisilane mit verschiedenen funktionellen Gruppen wie Halogen-, Amino-, Thioester- und Aldehydgruppen, Succinimid-, Carbodiimid- und andere gebräuchliche Kopplungsgruppen [H.G. Bäumert and H. Fasold, Methods in Enzymology, Vol. 172, p. 584] an die Oberflächen der planaren Trägerelemente wie z.B.

Siliziumdioxid, Glas, Keramik oder Polymere oder auch an die Wandungen der Si- oder polymeren Mikrokompartments gebunden.

5 Eine bevorzugte Immobilisierungsform ist die Nutzung der Gold- und Platinoberfläche als Immobilisierungsareal für Thiolderivate von Fängermolekülen, die sog. selbstorganisierende molekulare Monolayer auf diesen gut definierten Elektrodenoberflächen ausbilden [S.D. Evans et al., J. Amer. Chem. Soc. 113 (1991)5866].

10 In einer anderen Ausführungsform werden die im ganzen mit Self-assembling-schichten auf den Elektroden belegten Arraypositionen teilweise wieder gereinigt. Moleküle, die sowohl auf Detektions- als auch Hilfsflächen gemeinsam auf den Metalloberflächen immobilisiert wurden, können durch Applikation elektrischer Felder gezielt von den Detektorelektroden wieder desorbiert werden. Durch elektrische Potentiale wird die
15 Desorption von Thiolen erreicht, so daß die Detektionselektroden frei von Beschichtungen werden. Sie können dann Produkte detektieren, die z.B. auf anderen Flächen der Sensorposition, wie den metallischen Hilfsflächen gebildet werden.

Alternativ zu den vorstehend beschriebenen Immobilisierungen von affinitätsbindenden
20 Molekülen auf den Elektroden oder Hilfselektroden oder metallischen Hilfsflächen bzw. den Wandungen oder anorganischen Teilflächen der einzelnen Sensorareale können diese affinitätsbindenden Moleküle wahlweise auch über den Sensorpositionen angeordnet und dazu an partikulären oder gelartigen Trägern gebunden werden. In dieser Form ist es möglich, die Produkte der Enzymmarker von biochemischen Assays ,
25 die an kugelförmigen oder partikelförmigen Polymeren oder metallischen oder mineralischen Partikeln gebunden sind, in den o.g. Mikrokompartments anzuordnen oder mechanisch, beispielsweise durch Einschluß zu fixieren. Auch die Fixierung magnetischer Trägerpartikel in den Mikrokompartments durch Magnete unterhalb der Chips ist geeignet, unterschiedliche Sensorpositionen zu beladen.

30 Auch das Einbringen von Gelen mit inkorporierten affinitätsbindenden Molekülen oder Molekülkomplexen in den Mikrokompartments zwischen den Wänden 8 oder über die gesamte Sensorfläche ist möglich. Solche Gele können üblicherweise durch Diffusion oder elektrisch unterstützte Diffusion wie bei der Gelelektrophorese mit biochemischen
35 Assays oder Assaykomponenten beladen werden. Durch die Anordnung mehrerer Ultramikroelektroden an jeder Arrayposition ist dies im Gegensatz zu anderen beschriebenen Verfahren an jeder einzelnen Sensorposition unabhängig möglich.

In einer besonderen Ausführungsform werden die an der Sensoroberfläche immobilisierten Moleküle partiell in den Kompartments oder homogen über die gesamte Sensorfläche mit einem diffusiblen Hydrogel bedeckt. Das Gel wirkt als Schutzschicht oder erleichtert den Molekültransport durch Elektrophorese.

Die Anordnung immobilisierter biochemischer Assays an Partikeln oder in Gelen über den Elektroden wird dadurch möglich, daß Detektionsverfahren wie das Redox-Recycling, die niedermolekularen von den Assays produzierten und an die Elektroden diffundierenden Enzymprodukte messen, solange die Wassereinlagerung in den Gelen oder Zwischenräumen zwischen Partikeln eine Diffusion gestatten. Das Redox-Recycling selbst ist durch die geringen Distanzen zwischen den Ultramikroelektroden dadurch ausgezeichnet, daß aufliegende Partikel oder Gele solche Detektionen nicht stören, da sie vorzugsweise in oder nahe der molekularen Doppelschicht, die durch Polarisation an den Elektrodenoberflächen entsteht, verlaufen. In gleicher Weise ist auch eine impedimetrische Detektion an den Ultramikroelektroden im Gegensatz zu üblichen Verfahren, die weit voneinander entfernte Elektroden nutzen [V.M. Mirsky et al. Biosensors & Bioelectronics 12,9-10(1997)977] weitgehend partikelunabhängig. Bei Ultramikroelektroden mit einem Elektrodenabstand von 200 nm und ca. 1 µm langen DNA-Molekülen, die an deren Oberfläche in größter Nähe zueinander affinitätsgebunden sind, verläuft das elektrische Feld zwischen 2 Ban­delektroden im wesentlichen durch die Moleküle selbst, wobei weiter entfernte Partikel ebenso wie der Grundelektrolyt in der Lösung wenig Einfluß haben.

Eine individuelle Kontrolle elektrochemischer Prozesse zur Detektion an jeder einzelnen Arrayposition erfolgt unabhängig in der Weise, daß durch elektrisches Auslesen und damit verbundenes Schalten (Adressieren) diese Prozesse nicht gestört werden. Die Elektrodenpolarisation wie sie beispielsweise für das voltametrische Redox-Recycling benötigt wird, wird an allen Sensorpositionen individuell erzeugt. Dies ist problemlos durch Multipotentiostaten mit direkten Leiterbahnen zu jeder Chiparrayposition und jeder Einzelelektrode simultan und parallel möglich, vgl. Hintsche et al., Biosensors & Bioelectronics, 9(1994)697. Da auf diese Weise die Zahl der möglichen Sensorpositionen sehr durch den elektronischen Aufwand beim Meßgerät begrenzt ist und auch durch die Zahl der Leiterbahnen limitiert ist, werden die einzelnen Detektorelektroden seriell, d. h. nacheinander vermessen. Dabei bleiben die elektrischen Potentiale zur Polarisation für Anode und Kathode beim Redox-Recycling auch dann erhalten, wenn die Elektroden einzeln nacheinander oder in Gruppen (Reihen oder Spalten) mittels individueller Schalter an ein Meßgerät über integrierte Meßleitungen auf dem Sensorchip angeschlossen werden.

In der einfachsten Ausführungsform mit direkter Kontaktierung der Elektrodenpositionen nach Figuren 1 wird dazu ein ASIC 25 "off Chip" benutzt. Bezüglich der Messung hat er die Funktionalität eines Multiplexers, d.h. die individuell mit dem ASIC verbundenen Sensorpositionen 4 werden seriell (nacheinander) adressiert und auf einen einzigen Bipotentiostaten 34 zur Auslesung geschaltet. Die einzelnen Schalter des Multiplexers sind nicht als Ein-Aus-Schalter, sondern als Umschalter ausgelegt. Im nicht adressierten (nicht ausgelesenen) Zustand verbinden sie die Sensorpositionen mit einer Biasspannung, die der Aufrechterhaltung der Elektrodenpolarisation während des Nichtlesezustands dient. Veranschaulicht wird dies mit Figur 6. Hier sind dieselben zuvor anhand der Figur 3 beschriebenen Schalterzustände eingezeichnet, so daß diese Figur selbsterklärend ist. Zum Potentiostaten gehören noch eine Referenzelektrode und Gegenelektrode (Ref und Aux), deren Verwendung bekannt ist. Die nur einseitigen Mikroelektroden als WE1, WE2, WE3 bis WEn entsprechen den Elektroden 3 von Figur 3. Der Multiplexer 10 entspricht der Adressensteuerung und der eingeschaltete Zustand entspricht dem adressierten oder Lesezustand, bei dem WE1 über den aktivierten Schalter 12 an die Leseleitung 18 gekoppelt ist. Alle anderen Sensorpositionen sind mit abgeschalteten Schaltern 12 und eingeschalteten Schaltern 13 an das Potential zur Elektrodenpolarisation geschaltet, das an der Leitung 21 anliegt. Die Schaltung 35 ist nicht im Bereich der Sensorpositionen, sondern außerhalb des Trägers 1 vorgesehen.

In einer komplexeren Ausführungsvariante wird die störungsfreie Umschaltung beim seriellen Adressieren eines größeren Arrays von Sensorelektroden, wie in Figur 3 dargestellt, dadurch erreicht, daß neben üblichen Adreß- und Meßleitungen, wie sie für elektronische Speicher seit langem verwendet werden, zusätzliche potentialführende Leitungen 20, 21 mit Biaspotentialen E, F bzw. Spannung E - F am Träger 1 angeordnet werden. Die Adressierung wird dabei von einem Adressierelement 10, das außerhalb des eigentlichen elektrischen Sensorarrays in Figur 3 angeordnet sein kann, über die Adreßleitungen 14/15 und 16/17 ausgeführt werden. Die Meßleitungen 18 und 19 in Figur 3 und die Biasleitungen 20 und 21 werden dabei von speziellen Leseverstärkern 11 ausgelesen, die ebenfalls außerhalb des eigentlichen elektrischen Sensorarrays angeordnet sind. Durch die parallelen Meßleitungen 18 werden dabei alle Elektroden 3 der unterschiedlichen Sensorpositionen zeilenweise erfaßt und individuell gemessen, während die parallelen Meßleitungen 19 alle Interdigitalelektroden 3' in Figur 3 zeilenweise (reihenweise) erfaßt und individuell messen kann. Alle Elektroden 3 werden von der Biasleitung 21 mit der gleichen Polarisierungsspannung E, die z.B. für die Oxidation einer zu detektierenden Molekülart erforderlich ist, versorgt. In gleicher Weise

können alle Elektroden 3' durch die Biasleitung 20 mit dem Potential F für die Elektrodenpolarisierung, das für eine Reduktion notwendig ist, versorgt werden.

Die an jeder Sensorposition 4 integrierten Umschalteneinrichtungen 12 und 13 (als 12, 12' und 13, 13') bewirken dabei die Umschaltung zwischen einem Lese- und einem Nichtlesezustand. Beim Lesezustand wird die ablaufende elektrochemische Reaktion einer Sensorposition meßtechnisch über ein Paar von Meßleitungen 18, 19 erfaßt und gleichzeitig mittels des Multipotentiostaten gesteuert. Im Nichtlesezustands werden die elektrochemischen Vorgänge, z.B. Oxidation oder Reduktion, durch die im Abstand der Sensorpositionen parallelen Biasleitungen 21 für 3 und 20 für 3' kontinuierlich mit den Polarisationsspannungen versorgt und kontrolliert.

Die Schaltelemente 12, 12' und 13, 13' werden z.B. mit konventioneller CMOS-Technologie mit üblicher Halbleitertechnologie in Siliziumwafern an jeder Sensorarrayposition 4 lokal angeordnet. Über diesen integrierten CMOS-Schaltern, an die Meß-, Bias- und Adreßleitungen geführt werden, befindet sich eine flüssigkeitsresistente Isolationsschicht, z.B. aus Siliziumoxinitrit, wahlweise in Kombination mit Siliziumdioxid. Der Kontakt zwischen den Schaltelementen 12 und 13 und den individuellen Elektroden 3 und 3', die in der beschriebenen Dünnschichttechnologie auf dieser Isolationsschicht durch Elektronenstrahlverdampfen oder Sputtern und ähnliche Prozesse aufgebracht werden, wird durch eine senkrechte Durchkontaktierung zur CMOS-Elementebene im Silizium erzeugt. Alle Strukturen oberhalb dieser flüssigkeitsresistenten Isolationsschicht entsprechen den in Figuren 1 und 2 dargestellten Details mit dem Unterschied, daß die in Figuren 1 gezeigte direkte Kontaktierung durch Leiterbahnen entfällt. Die besondere Konstruktion der integrierten CMOS-Schalteneinrichtungen 12 und 13 ermöglicht es, das Umschalten vom Lese- in den Nichtleseprozeß oder -zustand für die interdigitalen Ultramikroelektroden ohne Einfluß zu realisieren. Dies ist notwendige Voraussetzung für den gesamten meßtechnischen Prozeß, da sich durch die Elektrodenpolarisation an der Elektrodenoberfläche eine elektrochemische Doppelschicht ausbildet, die als eine Art chemisches Gedächtnis während des Schaltprozesses erhalten bleiben muß.

Der Umschaltprozeß dauert nur Mikrosekunden, so daß während dieser Zeit lokal vorhandene Elektrodenkapazitäten 33 als Spannungsspeicher wirken. Danach ist die Versorgung der Elektroden von den Meßleitungen 18 und 19 auf die Biasleitungen 20 und 21 mit Polarisationsspannung umgeschaltet.

In Figur 3 stellen die schwarzen Vollkreise 12, 12' diejenigen Schaltelemente dar, die im Lesezustand von den Meßleitungen 18 und 19 mit der Polarisationsspannung versorgt werden und durch diese Leitungen auch mit den Leseverstärkern zur Detektion des elektrochemischen voltametrischen oder impedimetrischen Ereignisses verbunden sind.

Die Adressierung vom elektronischen Element 10 erfolgt dabei spaltenweise, so daß sich, wie schematisch dargestellt, mehrere Sensorpositionen 4 im Lesezustand befinden. Sie können durch das meßtechnische Element mit Leseverstärkern 11 nacheinander, mit einem Leseverstärker oder parallel mit zwei oder mehr Leseverstärkern ausgelesen werden bzw. der elektrochemische Vorgang verfolgt werden. Die spaltenweise

Adressierung durch die parallelen Adreßleitungspaare 14, 15 erlaubt eine beliebige Verlängerung dieser als Spalte adressierter Sensorpositionen und beliebig viele Elemente, die jeweils wieder durch parallele Meßleitungspaare 18, 19 nacheinander oder parallel durch Leseverstärker ausgemessen werden können. Nach Beendigung des Meßereignisses an dieser senkrechten mit schwarzen Schaltelementen dargestellten

Spalte von Sensorpositionen kann die benachbarte senkrechte Spalte mit den bisher inaktiven Schaltelementen 13, 13' durch das nächste Adreßleitungspaar 16, 17, die jeweils die Elektroden 3 oder 3' ansteuern, in die Meßposition wie vorstehend beschrieben umgeschaltet werden. Dies geschieht, nachdem die vorher in Lesezustand befindliche Spalte auf den Nichtlesezustand umgeschaltet wurde. So fortschreitend kann einzeln oder in Reihen jede Sensorposition adressiert und gelesen werden. Diese Meß-, Bias- und Adreßleitungen können in der Siliziumebene durch eine Mehrlagenverdrahtung realisiert werden, wie sie in der Siliziumtechnologie für elektronische Speicherbauelemente üblich ist.

Die Meß-, Bias- und Adreßleitungen sollen in Figur 3a an einem herausgezeichneten Array, der Sensorposition 100, verdeutlicht werden. In Figur 3 war nur eine betriebliche Darstellung gewählt, während in Figur 3a alle möglichen Schaltzustände eingezeichnet sind, die das Array 100 einnehmen kann. Zentral liegen die beiden Elektroden 3,3' mit ihren Zuführungen 6,6' und der Durchkontaktierung 12a,12a'. Eingezeichnet ist der adressierte Zustand, bei dem über die Schalterelemente 12,12' eine Kopplung der Elektroden 3,3' zu Meßleitungen 19,18 stattfindet. Diese Meßleitungen führen das Potential der Mikroelektroden aus dem Sensorarray heraus und machen es für die Meßeinrichtung 11 zugänglich. Die ebenfalls eingezeichneten und dasselbe Array 100 betreffenden nicht aktivierten Schalter 13,13' sind gestrichelt eingezeichnet. Sie sind erst dann aktiviert, wenn die Adreßleitungen 14 und 15 ihren Schaltzustand wechseln, so daß gleichzeitig der Schalter 12,12' abschaltet und die Schalter 13,13' einschalten. Koppeln letztere Schalter die Elektroden 3,3' von den Durchkontaktierungen 12a,12a' an die ebenfalls parallel verlaufenden Erhaltungsleitungen 20,21, so liegt eine erneute

unmittelbare Kopplung der Elektroden zu einem Erhaltungspotential vor, ohne daß eine Unterbrechung der Spannungsversorgung eintrat.

Die Adreßleitungen 14,15 werden von der Spaltenadressiereinheit 10 so angesteuert, daß immer eine Spalte von Sensorpositionen in einem adressierten Zustand mit eingeschalteten Schaltern 12,12' ist, während alle übrigen Sensorpositionen durch ein jeweils invertiertes Signal auf den Leitungen 16,17 von Figur 3 abgeschaltet sind. Die Leitungen 16,17 entsprechen den Leitungen 14,15 funktionell, nur sind sie für die betriebliche Darstellung der Figur 3 mit einem anderen Bezugszeichen versehen; sie aktivieren die Schalter 13,13' und deaktivieren die Schalter 12,12'.

Schematisch ist mit einer Schaltertechnik in Figur 3a im unteren Teil der eingeschaltete Zustand bei geschlossenen Schaltern 12,12' gezeigt, während die Schalter zum Bereitstellen der Erhaltungsspannung 13,13' geöffnet sind. Die Adreßleitungen 14,15 werden dabei an der Sensorposition einmal invertiert, so daß beide Schaltzustände immer komplementär vorliegen und ein Wechsel des Schaltzustandes der Adreßleitung einen Wechsel in der Schalterstellung des einen jeweiligen Umschalter bildenden Schalterpaares 12,13 sowie 12',13' ermöglicht.

Die hier beschriebenen Umschalter finden auch bei der später folgenden Figur 4 Anwendung, zunächst soll hier aber das Verständnis der Umschalter dadurch vertieft werden, daß auf die Figuren 8,8a Bezug genommen wird. Diese Figuren sollen mit Bezug auf Figur 3 und die ohnehin schon herausvergrößerten Umschalter an der Sensorposition 100 und der Figur 3a erläutert werden. Die Sensorposition 100 ist in Figur 8 oben gezeigt, die Sensorposition 101 ist in Figur 8 unten gezeigt. Symbolisch müßte die Figur 8 um 90° gedreht werden, so daß die Leitungen 18,21 als eine der Bias-Leitungen und eine der Meßleitungen mit den Figuren gleicher Bezeichnung von Figur 3 in ihrer Orientierung übereinstimmen. Figur 8 zeigt demgemäß nur den linken Schaltarm der Sensorposition 100 und den linken Schaltarm der Sensorposition 101, also einen adressierten Zustand und einen nicht-adressierten und mit Erhaltungsspannung gekennzeichneten Zustand. Die einzelnen Schaltelemente, die zum Umschalten verwendet werden, sollen kurz erläutert werden. Gezeigt ist die Adressenleitung 14 und die parallele Adressenleitung 16, die unterschiedliche Potentiale besitzen. Eine logische "Null" auf der Adressenleitung 14 sorgt für ein Einschalten der CMOS-Transistoren 50,53, von denen einer als p-Kanal und einer als n-Kanal-Transistor ausgebildet ist, um in beiden Richtungen Ströme leiten zu können. Die Transistoren 52,51 haben keine logische Schaltfunktion, sondern dienen nur der Kompensation von Umschaltstörungen.

Die Transistoren 50 bis 53 bilden einen kapazitätskompensierten Schalter 33, entsprechend der Funktion 12.

Mit der eingezeichneten logischen Null an der Adreßleitung erhält der n-Kanal-Transistor 50 ein Einschaltsignal "1" und der p-Kanal-Transistor 53 ebenfalls. Damit ist das Potential der Leitung 18, das hier mit D bezeichnet ist, an der Anschlußleitung 6 zu der Mikroelektrode 3 durchgeschaltet bzw. durchgekoppelt.

Das CMOS-Transistorpaar 40,41 repräsentiert den anderen Schalter 13, der hier abgeschaltet ist. Die Verbindung der Gates ist so gestaltet, daß bei einer logischen Null auf Leitung 14 der Schalter 13 gesperrt ist. Wechselt das Potential, so ändert sich der Schaltzustand der beiden Schalterelemente 12,13, wie in Figur 8 im unteren Teil gezeigt. Hier ist auf der Adressenleitung 16 (gemäß Figur 3) eine logische "1" Ursache dafür, daß die Transistoren 40',41' des Schalters 13 einschalten und eine bipolare Stromrichtung ermöglichen, so daß das Erhaltungspotential E auf der Leitung 21 zu dem Anschluß 6 der Elektrode 3' durchgekoppelt wird. Die beiden Transistoren 50' und 53' sperren bei diesem Schaltzustand der Leitung 16, um den nicht-adressierten Zustand einzunehmen.

Noch deutlicher wird der Schaltzustand anhand von Figur 8a, bei dem die Arrayposition 100 eingezeichnet ist und beide Mikroelektroden 3,3' mit Umschaltern angesteuert sind. Diese Darstellung entspricht der schematischen Darstellung von Figur 3a, sie ist hier nur insoweit verallgemeinert, als diese Schaltkonfiguration für alle Arraypositionen (Sensorpositionen) 100,101,102,110,111,112 von Figur 3 (und auch von Figur 4) gilt. Die entsprechenden Zuordnungen der Biasleitungen 20,21, der Meßleitungen 18,19 sowie der Adreßleitungen ist durch die eingezeichneten Bezugsziffern ohne weiteres ersichtlich, wenn Figur 3 zu Hilfe genommen wird, so daß eine vertiefte Erläuterung der sich aus Figur 8 und Figur 3 sowie Figur 3a ergebenden Figur 8a hier nicht stattfinden soll.

In einer anderen spezifischen Ausführungsform, die in Figur 4 schematisch dargestellt ist, werden an den Sensorpositionen zusätzlich neben den CMOS-Schalteinrichtungen 12 und 13 zusätzlich integrierte Elemente zur Auslesung, Verstärkung und gegebenenfalls zur Zwischenspeicherung vorgesehen. Dabei wird der Lesezustand, wie vorstehend zu Figur 3 beschrieben, in gleicher Weise durch die Adreßleitungen 14, 15 bestimmt und die übrigen Sensorpositionen mit den Adreßleitungen 16, 17 über die Biasleitungen 20 und 21 potentialmäßig kontrolliert und durch die Meßleitungen 18, 19 ausgelesen. In den elektronischen Elementen 22, 22' und 23, 23' in Figur 4 sind an jeder Sensorposition und an jeder individuellen Elektrode 3 und 3' elektronische Verstärker angeordnet. Dabei wird

an der Sensorposition direkt das elektrochemische Meßsignal, was durch die Elektrodenprozesse generiert wird, über Vorverstärker verstärkt und kann dann entsprechend Figur 3 über das Meßleitungspaar 18, 19 im adressierten Zustand ausgelesen werden. Bei dieser Verfahrensweise sind die nichtadressierten
5 Leseverstärker in den elektronischen Elementen 23, 23' der parallelen, benachbarten Spalten ohne Funktion.

In einer besonderen Ausführungsform werden in die elektronischen Elemente 22, 22' und 23, 23' zusätzlich Speicher integriert. Da der elektrochemische Prozeß durch die
10 konstant erhaltene Elektrodenpolarisation auch in den Zeiten abläuft, in denen sich Sensorpositionen im Nichtlesezustand befinden, wird diese Zeit genutzt, um über die Leseverstärker der Elemente 23, 23' das in den Ultramikroelektroden generierte Signal in einem beispielsweise elektronischen Zwischenspeicher zu akkumulieren und abzuspeichern. Bei dieser Ausführungsform wird das an den Elektroden generierte Signal
15 über Leseverstärker in einen Zwischenspeicher gegeben, der beim späteren Lesevorgang über die Meßleitungen ausgelesen wird. Beim Lesevorgang wird das während der gesamten Zeit des Nichtlesezustandes im Speicher akkumulierte elektrochemische Ergebnis sehr rasch ausgelesen.

Es ist bei dieser Anordnung nicht notwendig, längere Meßzeiten während eines Auslesevorganges einer Sensorposition 4 in Kauf zu nehmen. Die besondere Konstruktion mit den zusätzlichen Biasleitungen macht diese Art der (verborgenen) Meßwertgewinnung und Zwischenspeicherung möglich. Man erreicht auf diese Weise eine erhebliche Beschleunigung des Ausleseprozesses und eine wesentliche
25 Verbesserung des Nutzsignals. In der Ausführungsvariante gemäß Figur 4 lassen sich durch die Integration elektronischer Komponenten an den einzelnen Sensorpositionen auch elektrische Sensorarrays mit höherer Dichte der Arraypositionen (1000 und mehr) anordnen.

Typisch für die integrierten CMOS-Schalter und elektronischen Zusatzelemente unterhalb der Arraypositionen im Silizium werden Standard-Transistoren, wie in Figur 5 schematisch gezeigt, als CMOS-Wanne 24 mit Source 25 und Drain 26 angeordnet. Gates und Leiterbahnen aus Polysilizium 31 verbinden wie auch CMOS-Aluminium 27 im CMOS-Dielektrikum 28 die chip-internen Elemente. Ebenfalls mittels Aluminium oder
35 auch Wolfram wird die Kontaktierung der chip-internen Elemente mit den Elektroden an den Sensorarraypositionen durch eine flüssigkeitsdichte Siliziumnitrid-Passivierung 29 hindurch erreicht. Der Kreuzungsbereich 32 zeigt exemplarisch, wie sich Leiterbahnen kreuzen, z.B. die Adreßleitung 15 mit der Meßleitung 18 gemäß Figur 4.

Die vorstehend beschriebenen mit verschiedenen elektronischen Elementen
ausgerüsteten elektrischen Sensorarrays eignen sich alle in gleicher Weise für eine
Multianalytmessung. Wie vorstehend beschrieben, wird die Immobilisierung
unterschiedlicher affinitätsbindender Moleküle auf einzelnen Sensorarraypositionen, z. B.
5 in den Mikrokompartments, ausgeführt, indem durch Mikrodosierung beispielsweise
tintenstrahlanaloge Dosiertechnik (z.B. Piezodosierer) oder Mikrokapillardosierung die
Reaktionslösungen zugeführt werden. Es ist ebenso möglich, durch Stempeltechniken
individuell auf einzelne Positionen Moleküle aufzubringen, die dann reagieren oder
haften. Beispielsweise werden Selfassembling-Schichten durch sog. Kontaktstempelung
10 vom Stempel auf die Elektrodenoberfläche übertragen und damit individuell über eine
Thiol-Goldbindung belegt.

Bei einer anderen Ausführungsform wird die Immobilisierung durch aufgesetzte
Mikrodurchflußsysteme bzw. Stempel für die Applizierung von Flüssigkeiten durch Ein-
15 und Ausflußöffnungen über einzelnen Arraypositionen oder in Gruppen oder in Reihen
erreicht. Die so mit unterschiedlichen affinitätsbindenden Molekülen ausgestatteten
Arraypositionen aller Ausführungsformen werden dann mit einem Multianalytgemisch in
ihrer Gesamtheit in Kontakt gebracht. Dies kann durch Tauchen des Sensorarrays in die
Analytlösung oder durch Einbau in eine Durchflußzelle oder durch Befüllen von
20 Kompartimenten an den Einzelpositionen erfolgen. Die unterschiedlichen
affinitätsbindenden Moleküle auf oder über den Arraypositionen binden durch ihre hohe
Spezifität ausschließlich ihr Zielmolekül, sofern es im Analytgemisch vorhanden ist.
Dieser Bindungsprozeß ebenso wie ein analoger Bindungsprozeß an immobilisierten
Molekülen in Gelen oder auf Partikeln ist Voraussetzung für den folgenden
25 elektrochemischen Detektionsprozeß. Die Verwendung von trägergebundenen
Fängermolekülen erzielt hohe Beladungsdichten in einer Sensorarrayposition, da nicht
nur die Flächen, sondern das Volumen genutzt werden.

Für das Redox-Recycling werden Enzymmarker verwendet, die entweder mit dem
30 Zielmolekül an die Sensorarrayposition eingeführt werden oder nach der erfolgten
spezifischen Bindung durch sekundäre Bindungsprozesse wie Antikörperbindung,
Interkalation, kovalente Anheftung und andere gebräuchliche Markierungsreaktionen
gebunden werden. Die Markerenzyme, die sich nur an Arraypositionen befinden, an
denen die molekulare Erkennungsreaktion stattgefunden hat, werden mit einem
35 elektrochemisch inaktiven Substrat z. B. p-Aminophenylphosphat versetzt, das dann
durch die Enzymreaktion in ein elektrodenaktives Produkt das p-Aminophenol
umgewandelt wird. Im zyklischen Prozeß einer an Anode und Kathode der bandförmigen
Ultramikroelektroden ablaufenden Oxidation und Reduktion wird ein Summenstrom

ermittelt, der mit der Menge der an dieser Arrayposition gebundenen Moleküle streng korreliert. Bezogen auf gebundene Analytmoleküle muß die Menge eingeführten Markerenzyme quantitativ und stöchiometrisch sein. Nutzt man die zur Immobilisierung hergestellten Mikrokompartments auch zur Volumentrennung bei dieser Art Detektion aus, ist die in jedem Mikrokompartiment entstehende Konzentration an elektroaktiven Spezies ein quantitatives Maß für die Zahl der an dieser Arrayposition individuell stattgefundenen Erkennungsreaktionen. Auf diese Weise bedeutet das Fehlen einer elektrochemischen Reaktion auch das Ausbleiben des Erkennungsereignisses und damit die Abwesenheit des gesuchten Analyten an der jeweiligen Arrayposition.

Die von den Enzymmarkern für das Redox-Recycling erzeugten elektrodenaktiven Moleküle können problemlos in wasserhaltigen Gelen an die Elektrodenoberfläche diffundieren. Auch aus einer Partikelpackung über dem Elektrodenarray diffundieren sie über die Flüssigkeit zwischen den festen Partikeln, wobei im geringen Restvolumen besonders rasch eine Konzentrationserhöhung herbeigeführt wird.

Da sich der Detektionsprozeß durch das Ultramikroelektrodenverhalten nur unmittelbar an der Elektrodenoberfläche abspielt, ist die bestimmende Zone die Elektrodendoppelschicht und wenige Moleküllagen darüber. Dadurch ist die Methode unabhängig von Konvektion und allein durch die Braun'sche Molekularbewegung bestimmt, so daß jegliches aktives Rühren unterbleiben kann und zum Beispiel mit Stop-Flow-Verfahren oder geschlossenen Kammern und Mikrokompartments gearbeitet werden kann.

In einer anderen Ausführungsform, wenn die Mikrokompartments nach erfolgter Immobilisierung wieder entfernt wurden, erhält man nur qualitative Aussagen für die An- oder Abwesenheit von Analyten unter der Bedingung, daß die Konvektion sich bildender Markerenzymprodukte genügend unterdrückt wird, z.B. durch ausreichenden Abstand der Positionen und stopped flow Analytik.

In einer weiteren Ausführungsform werden die planaren Sensorpositionen zur Redox-Recycling- Detektion wieder mit volumentrennenden Elementen für die Sensorpositionen versehen. Dies kann beispielsweise auch durch das Aufsetzen der vorstehend zur Immobilisierung beschriebenen Stempel erfolgen. Es lassen sich damit Einzelsensorpositionen, Gruppen von Sensorpositionen oder Reihen von Sensorpositionen separat erfassen und messen.

Bei einer anderen Ausführungsform, die die elektrochemische Impedanzspektroskopie als Detektionsmethode verwendet, werden ebenfalls die in Figuren 1, 3 und 4 beschriebenen Anordnungen der elektronischen Schalt- und Zusatzelemente mit Wechselstrom verwendet. Die Spezifität dieser Meßmethode und der Abstand der Elektroden in den nm-Dimensionen machen es möglich, eine solche Reaktion markerfrei zu vermessen.

Zur Messung werden Wechselströme mit bestimmter Frequenz oder Frequenzgemische von 0,1 Hz – 1 MHz auf eine Biasspannung von vorzugsweise 10 – 200 mV aufgeprägt, die in der gleichen Weise wie die Elektrodenpolarisation für die voltametrischen Methoden an die Elektroden der Sensorpositionen angelegt wird. Bei dieser Detektionsmethode werden Elektrodenabstände < 500 nm, bevorzugt 20 – 200 nm, verwendet. Wie bei den Ausführungsvarianten für das Redox-Recycling werden die auf oder zwischen den Elektrodenoberflächen in der Sensorarrayposition immobilisierten, affinitätsbindenden Moleküle mit dem Gemisch verschiedener Analyte zusammengebracht und die molekulare Erkennungsreaktion läuft wie voranstehend beschrieben ab. Mit den durch die geringen Elektrodenabständen erzielbaren starken elektrischen Feldern von einigen MV/m kann auf jeder Position individuell vermessen werden, wie die affinitätsbindenden Moleküle die Elektrodenoberfläche bedecken. Dies zeigt sich entsprechend der Bedeckung der Oberflächen durch die Abnahme der Kapazität der Ultramikroelektroden. Erfolg der Immobilisierung und der Bedeckungsgrad lassen sich auf diese Weise quantitativ verfolgen. Die mit affinitätsbindenden Fängerelektroden versehenen einzelnen Sensorarraypositionen werden individuell mittels Impedanzspektroskopie vermessen, wobei Kapazität, Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante sowie der Phasenwinkel durch die Messung und ihre Auswertung separiert werden können. Nach erfolgter Erkennungsreaktion an einer einzelnen Arrayposition, die üblicherweise mit einem größeren Biomakromolekül erfolgt, bildet sich ein großer Molekülkomplex, der typischerweise größer ist als der Abstand zwischen zwei Elektroden. Das elektrische Feld reicht dabei nicht erheblich über diese Molekülkomplexe hinaus und erfaßt so nur die elektrodennahen Bereiche, so daß schwebende Partikel nicht stören. Eine neue Impedanzmessung nach erfolgten Erkennungsreaktionen mit den gleichen Parametern wird zur Differenzbildung benutzt. Eine sichtbare Veränderung gibt Auskunft darüber, an welchen Positionen Komplexbindungen stattgefunden haben. Die Impedanzänderung wird durch die Verdrängung des Elektrolyten und Beeinflussung des elektrischen Feldes z.B. durch geladene DNA-Moleküle hervorgerufen.

Im Unterschied zum quantitativen Redox-Recycling ist die impedanzspektroskopische Detektionsmethode semiquantitativ und gestattet eine Aussage über stattgefundene oder

nicht stattgefundenen molekulare Erkennungsreaktionen. Die Parameter, die bei der Impedanzspektroskopie ausgewertet werden, erlauben Aussagen über die Größe der Moleküle, die an der Elektrodenoberfläche bei der Erkennungsreaktion gebunden haben sowie über den Ladungszustand dieses Moleküle. Auch die Dichte der Molekülbelegung hat Einfluß auf das Meßergebnis. Alle Parameter können zur näheren Analyse des molekularen Erkennungsvorgangs und der beteiligten Partner herangezogen werden.

In einer speziellen Ausführungsform wird das elektrische Sensorarray nach Immobilisierung der affinitätsbindenden Moleküle oder nach stattgefundenen molekularer Erkennungsreaktion und entsprechender Waschvorgänge mit einem Hydrogel belegt. Diese Belegung mit Hydrogel kann für verschiedene Verfahren zur Anwendung der elektrischen Sensorarrays vorteilhaft sein. Bei der Bedeckung der oberflächengebundenen affinitätsbindenden Moleküle mit Hydrogel können z.B. die Analyte aktiv durch Dosierung oder elektrophoretisch durch Applikation elektrischer Felder mittels Hilfselektroden in das Gel und an die Affinitätspartner herangebracht oder durch Diffusionsprozesse zugeführt werden. Die Beschichtung mit Hydrogelen nach stattgefundenen molekularer Erkennungsreaktion an den Oberflächen kann auch dazu verwendet werden, zusätzliche Marker oder Reagenzien durch elektrophoretische Prozesse oder Direkt dosierung an die Molekülkomplexe heranzuführen und zu detektieren.

Alternativ werden Hydrogele benutzt, um partikelgebundene immobilisierte Fängermoleküle oder nach stattgefundenen molekularer Erkennungsreaktion immobilisierte Zielanalyte in den Mikrokompartments einzuschließen. Die Methode ist bevorzugt geeignet für die Anwendung des Redox-Recycling, da die diffundierenden Enzymprodukte durch das Gel wenig gehindert werden, an die Elektrodenoberfläche zu gelangen. Zu beobachten ist dabei lediglich eine Verlangsamung der Diffusion.

In einer anderen Ausführungsform werden die Hydrogele über das gesamte elektrische Sensorarray gleichmäßig aufgebracht und bewirken durch ihre Diffusionshemmung eine verbesserte Zuordnung der Bindungsvorgänge zu einzelnen Arraypositionen, ohne daß Mikrokompartments hergestellt wurden.

Die an den einzelnen Sensorpositionen angeordneten Elektroden und flächenförmigen oder mit Punktelektroden besetzten Hilfselektroden sowie die spiral- oder kreisförmig angeordneten Bandedelektroden nach Figuren 2 können neben ihrer Verwendung für die Detektionsprozesse selbst auch zur Applikation elektrischer Felder im Sinne einer Freifeld- oder Gelelektrophorese eingesetzt werden. Für die Heranführung geladener

Analytmoleküle oder Reagenzien an die Elektrodenoberflächen, z.B. an den Ort der molekularen Erkennungsreaktionen, können besonders vorteilhaft parallel angeordnete interdigitale Ultramikroelektroden nach Figuren 2b, 2c, 2d oder 2g verwendet werden.

Dabei werden in einer Ausführungsform des Verfahrens die beiden Ultramikroelektrodenpaare in Figuren 2b, 2c und 2d beispielsweise in der Weise zu einem elektrophoretischen System geschaltet, daß immer zwei zusammengehörige interdigitalen Fingerpaare oder Paare von bandförmigen Ultramikroelektroden einen Pol des elektrischen Feldes bilden. Je nach Polarisierung und Ladung der Moleküle werden elektrophoretische Transportvorgänge eingeleitet. Verwendet man Felder mit niedriger Frequenz im unteren Hz und mHz-Bereich, werden wechselseitig Moleküle an die Elektroden herangeführt. Üblicherweise werden die elektrischen Felder in Sequenzen erzeugt. In den stromlosen Pausen können durch Elektrolyse gebildete Gase abdiffundieren und auch pH-Gradienten sich ausgleichen.

In einer anderen Ausführungsform werden die Hilfselektroden wie in Figuren 2e und 2f zur Applikation der vorstehend beschriebenen elektrischen Felder benutzt. Sie können dabei die gleiche Polarisierung aufweisen und gegen ein interdigitales Elektrodenpaar 3, 3' geschaltet werden, oder es wird das Feld zwischen den Hilfselektroden 3e und 3e' bzw. 3f und 3f' erzeugt, so daß die Moleküle in die Nähe der Detektionselektroden 3, 3' gezogen werden. Im Gegensatz zu den flächenhaften Hilfselektroden 3e und 3e' erlauben die Hilfselektroden 3f und 3f' durch die punktförmigen aktiven Elektrodenflächen mit Ultramikroelektrodencharakter eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche durch eine verbesserte Diffusion. Auch durch die Elektrodenkonstruktion 3g und 3g' kann eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche als für die Elektroden 3 und 3' erreicht werden. Im Ergebnis dieser punktförmigen Strukturierung gibt sich durch hemisphärische Diffusion der Vorteil, daß eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche erreicht werden kann, trotzdem die aktive Elektrodenfläche verkleinert ist.

Diese Ausführungsform zur Heranführung von Analyt oder Reagenzmolekülen an die Elektrodenoberfläche wird ergänzt durch die gleichzeitige Verwendung der Detektions- und Hilfselektroden zur Erzeugung elektrischer Felder nach stattgefundener Erkennungsreaktion. Bei dieser Verfahrensweise werden die schon bei niedriger Spannung unter 1V entstehenden erheblichen Feldstärken zwischen den Elektroden dazu genutzt, daß schwach gebundene Moleküle von ihrem Affinitätspartner im Unterschied zu stärker gebundenen Molekülen von den Detektionselektroden wieder entfernt werden können. Schon das einfache "Ultramikroelektrodeninterdigitalpaar" in 3, 3' in Figur 2c gestattet die Beseitigung schwächer und damit falsch gebundener Molekülkomplexe. Dazu wird das applizierte Feld zwischen den Elektroden 3 und 3' als

Wechselfeld mit niedriger Frequenz (wenige Hz bis mHz) benutzt, von beiden Elektroden unerwünschte Spezies zu entfernen. Das Wechselfeld mit niedriger Frequenz bewirkt dabei, daß immer die Elektrode, die gleich zur Ladung des unerwünschten Moleküls geladen ist, durch ihr hohes Feld die Abstoßung dieses Moleküles bewirkt. Durch die Wechselfelder werden beide Elektroden nacheinander in diesen abstoßenden Zustand versetzt und die Reaktion findet im Summenergebnis auf beiden Interdigitalsystemen statt. Die Feldapplikation wird nach kurzer Zeit, d.h. wenige Zehntelsekunden bis Sekunden durch Pausen unterbrochen, in denen Gase und pH-verändernde Spezies abdiffundieren können. Die Reaktion kann durch biochemische Waschvorgänge oder durch Temperaturveränderung unterstützt werden. Eine Temperaturkontrolle kann sowohl extern als mit einem auf den Chips aufgebrachten Heizer aus Dünnschichtmetallbändern, wie Platin, realisiert werden.

Mit Elektrodenanordnungen, wie in Figuren 2b, 2d, 2e, 2f und 2i, ist die Anwendung des Prozesses, wie für Figur 2a beschrieben, für jedes Paar interdigitaler oder bandförmiger Ultramikroelektroden möglich. Prinzipiell kann dieser Prozeß durch Kombination beliebiger Detektor- und/oder Hilfselektroden mit dem gleichen Verfahren der niedrigfrequenten Feldumpolung und der Beseitigung schwach-bindender bzw. unerwünschter Moleküle von den Elektrodenoberflächen benutzt werden.

Als besondere Ausführung werden die in Figuren 2b, 2e, 2f und 2i außen liegenden Elektroden zur Felderzeugung verwendet, während die dazwischen liegenden Elektroden stromlos sind. Diese Art der Applikation kann auch zur Heranführung von Molekülen an die zwischenliegenden Elektrodenpaare benutzt werden, da sich diese in einer Art Feldkäfig befinden. Mit den gleichen multiplen Anordnungen sind überdies auch kombinierte Gleich- und Wechselstromapplikationen, Umpolungen sowie wahlweise Adressierung der Einzelelektroden möglich und damit gezielte Effekte der Molekülheranführung und der Molekülbeseitigung an beliebigen Elektroden zu erzielen.

In den Ausführungsformen gemäß Figuren 2e und 2f lassen sich die flächenförmigen oder mit Punkten besetzten Hilfselektroden so einsetzen, daß jeweils zu einer oder beiden Ultramikroelektroden die gewünschte Polung der Elektroden zur Beseitigung von Molekülen vorliegt. Hier ist Gleichstrom oder die niedrigfrequente Wechselstromapplikation über Kreuz, z.B. in Figur 2e zwischen Elektroden 3e und 3', bzw. 3e' und 3 möglich. Damit lassen sich die Einzelelektroden selektiv behandeln. Die unterschiedliche Behandlung der Elektrodensysteme in Figuren 2b, 2d, 2e und 2f läßt sich in einer anderen Ausführung auch dazu verwenden, daß an einzelnen Elektroden

unerwünschte Bindungen beseitigt werden und an anderen bestehen bleiben, so daß aus der Differenzmessung auf die Differenzmenge geschlossen werden kann.

An den kreisförmigen Elektroden gemäß Figur 2b oder spiralförmigen analogen Strukturen sind die vorstehend beschriebenen Verfahren zur Verwendung der elektrischen Felder dadurch besonders geeignet, daß durch eine zentrale Elektrode eine Art Feldkäfig über die dazwischen liegenden Elektroden gelegt werden kann, so daß diese auch im stromlosen Zustand von diesem Feld in gewünschter Weise zur Entfernung oder Heranführung von Molekülen genutzt werden können.

Die punktförmige Elektrodenanordnung in Figur 2h kann in einer anderen Ausführungsform vorteilhaft zur Erzeugung elektrischer Felder sowohl zur Anreicherung von Molekülen als auch zur Entfernung von Molekülen eingesetzt werden. Dazu werden diese Elektroden an verschiedenen Stellen eines Sensorarrays z.B. als außen liegender Ring oder konzentriert in Innenposition oder durch Kombination von beiden ausgewählten Positionen eines Sensorarrays angeordnet. Sie dienen zur Erzeugung starker Felder an anderen Arraypositionen über den Raum des Sensorarrays hinweg durch besonders hohe Stromdichten. Die erzielbare hohe Stromdichte bei vergleichsweise niedrigen Spannungen erzeugt Feldkäfige, die den Transport von geladenen Molekülen nach elektrophoretischen Prinzipien besonders verbessern.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit direkter Kontaktableitung in Siliziumtechnologie

5 Mikroelektrodenstrukturen entsprechend Figuren 1 und 2a werden in Standardsilizium-technologie hergestellt, vgl. Reimer et al., Sensors and Actuators, A 46/47(1995)66. Dazu wird 500 nm dickes thermisches Oxid auf 4"-Siliziumwafern erzeugt. Auf dem Oxid wird Fotolack photolithografisch so strukturiert, daß die Konturen der Elektroden für die
10 Elektrodenstrukturen freiliegen. Das Ultramikroelektrodensystem konzentrischer Ringe gemäß Figur 2a besteht aus ringförmigen Elektrodenbändern mit 1,5 µm Breite im Ringabstand von 800 nm. Die Ringe sind abwechselnd über die Leiterbahnen 6 mit den Kontakten gemäß Figur 2a verbunden. Es sind 16 Sensorpositionen in einer 4 x 4 Matrix mit Arraypositionen von 300 µm Durchmesser auf dem Sensorarray angeordnet. Die 2 x
15 16 Ableitkontakte befinden sich auf zwei benachbarten Seiten des 1 x 1 cm großen Siliziumchips. Die Abstände der Sensorarraypositionen betragen 400 µm, so daß ein aktives Gebiet von ca. 2,5 mm x 2,5 mm entsteht.

Durch 15 sec Tauchen in 10%ige Flußsäure wird das Oxid ca. 150 µm tief angeätzt. Eine
20 20 nm dicke Titanhaftschrift und eine 150 nm dicke Goldschicht werden auf die gesamte Oberfläche mittels Elektronenstrahl aufgedampft. Durch einen Lift-off-Prozeß wird alles Material zwischen den Elektroden, Leiterbahnen und Kontakten beseitigt. Der Wafer wird anschließend mit einer 400nm dicken Silizium-oxinitrid-Schicht bedeckt, die im Plasma durch chemische Abscheidung (PECVD-SiN_x:H) erzeugt wird. Im folgenden werden die
25 Arraypositionen und die außenliegenden Kontaktflächen durch reaktives chemisches Trockenätzen bis auf die Goldflächen freigelegt. Nach Aufschleudern eines Schutzlackes wird der Wafer von der Rückseite entsprechend der vorgesehenen Einzelchipkanten ca. 250 µm tief von der Rückseite eingesägt.

30 Beispiel 2: Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit direkter Kontaktierung auf Glas

Auf 4"-Pyrexglaswafern werden mit einer dem Beispiel 1 entsprechenden Photolithographie Interdigitalelektrodenarrays entsprechend Figur 2e mit 9
35 Sensorpositionen im Raster 3 x 3 strukturiert. Dazu wird abweichend von Beispiel 1 auf das Glas eine 20 nm dicke Chromhaftschrift gefolgt von einer 150 nm dicken Platinschicht aufgedampft und wie im Ausführungsbeispiel 1 durch Lift-off-Technik fertig strukturiert. Als Haftvermittler für die folgende Isolationsschicht wird eine 3%ige Lösung

von Alkyloxysilan in Aceton mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Die 400 µm großen Sensorarraypositionen im Abstand von 500 µm werden nach Aufschleudern einer 10µm dicken Polyimidschicht mit Standard-Photolithographie so strukturiert, daß die Kontaktflächen und die Sensorpositionen freigelegt werden. Das Interdigital-Elektroden-System mit Hilfselektroden entsprechend Figur 2e besteht an jedem Elektrodenfingersystem aus 90 je 200 µm langen und 1 µm breiten Fingern, wobei die Interdigitalabstände 0,9 µm betragen. Die Hilfselektroden 3e und 3e' sind wie in der Figur 2e dargestellt, bis 50 µm vom Rand der Sensorarrayposition flächig ausgeführt. Wie im Beispiel 1 wird der Wafer geschützt und eingesägt.

Beispiel 3: Herstellung eines elektrischen Sensorarray-Systems mit CMOS-Schaltern

Die Schalterebene wird mit einem CMOS-Standardprozeß, vgl. **Widmann, Mader, Friedrich**, Technologie hochintegrierter Schaltungen, Springer Verlag Berlin 1996, in einem Prozeß mit 1 µm Minimalstrukturen hergestellt. Die nach Figur 3 erforderlichen Kreuzungen von Leiterbahnen werden durch Überkreuzungen 32 von Polysilizium- 31a und Aluminium-Bahnen 27 realisiert. Der größere elektrische Widerstand spielt wegen der kleinen Sensorströme keine Rolle. Im verwendeten CMOS-Prozeß werden die Schalter 12, 12' und 13, 13' vorteilhaft als Transmission-Gates ausgeführt. Jeweils ein Transmission-Gate verbindet die Punkte 12a, 12a' mit der Leitung 18 bzw. 19 und die Punkte 13a, 13a' mit der Bias-Leitung 21 bzw. 20. Die Adreß-Leitungen 14, 15, 16, 17 bestehen aus einem parallel laufenden Paar von Leiterbahnen, an denen Signale komplementärer Polarität zu den Gates der beiden Transistoren eines Transmission-Gates geführt werden. Alternativ kann auch ein on-chip Inverter an jeder Sensorposition zwei komplementäre Signale aus einer Adreßleitung gewinnen, um die Transmission Gates 12, 13 komplementär anzusteuern. Bei der einen Polung ist das Transmission-Gate von 12a nach 18 leitend und das Transmission-Gate von 12a nach 21 sperrend (Schaltzustand 12). Bei der umgekehrten Polung ist 12a-18 sperrend und 12a-21 leitend (Schaltzustand 13). Die Transmission-Gates schalten sowohl positive als auch negative Ströme.

Zusätzlich zu den üblichen Anschlußpads einer CMOS-Schaltung an den Rändern des Chips enthält die Schaltung nach Figur 3 an den Stellen 12a, 12a' und 13a, 13a' Aluminiumpads, mit denen die Verbindung zu den Elektroden-Arrays hergestellt wird. Standardmäßig wird der CMOS-Prozeß mit der Aufbringung einer PECVD-Nitridschicht und Öffnung der Anschluß-Pads in dieser passivierenden Schicht abgeschlossen. Auf diese Isolationsschicht werden mit gleicher Liftoff-Technik, wie in Ausführungsbeispiel 1 dargestellt, Haftsicht und Goldelektroden 30 direkt aufgedampft und wie oben

beschrieben photolithographisch strukturiert. Eine weitere Passivierung ist nicht vorgesehen, da die Kontakte von den Interdigital- und Hilfselektroden direkt senkrecht in die darunterliegende Schalterebene geführt werden.

5 Beispiel 4: Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit Schaltern, Verstärkern und Integrator in CMOS-Technologie

Für die Herstellung des Ausführungsbeispiels nach Figur 4 werden der gleiche CMOS-Standard-Prozeß, sowie die gleichen Elektroden und Leitungsanordnungen benutzt, wie
0 unter Beispiel 3 beschrieben wurde. In der 1 µm-Technologie werden diese Bauteile auf einer Fläche von 300 µm x 400 µm angeordnet. Zwischen den Elektroden und den Transmission-Gates, die zu den Meßleitungen 18, 19 führen, liegt jetzt ein Operationsverstärker und eine integrierte Kapazität von 1 pF, die den Ausgang mit dem Eingang des Operationsverstärker verbindet. Weiterhin liegt ein Schalter parallel zu
5 dieser Kapazität. Von der Adressiereinheit 10 führen zusätzliche Steuerleitungen zu diesem Schalter, die ihn außerhalb der Meßzeiten geschlossen halten. In der beschriebenen Ausführung erzeugt ein Strom von 1 nA an den Elektroden am Ausgang des Operationsverstärkers nach 1 msec eine Spannung von 1 V. Diese Spannung wird wie in Beispiel 3 beschrieben mit Transmission-Gates auf die Meßleitungen 18, 19
0 geschaltet und mit dem Leseverstärker 11 gemessen.

Beispiel 5: Aufbau von Mikrokompartments mit vorgefertigten Polymeren

Elektrische Sensorarrays, wie sie nach Beispiel 1 bis 4 hergestellt worden sind, werden
5 mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Im folgenden Schritt werden sie durch das Auflaminieren einer vorher perforierten 400 µm dicken Polypropylen-Folie mit Mikrokompartments versehen. Die Perforation entspricht dabei den Größen der Sensorarraypositionen und den Kontaktflächen an den Außenrändern. Das Auflaminieren geschieht mittels Heißsiegel-
10 Technologie durch induktive Erwärmung. Die Justage der mittels eines Vakuumstempels in Wafergröße aufgebrachten Folie wird mittels Justiermarken auf der Waferoberfläche durch optische Kontrolle vorgenommen. Der auf -10° C gekühlte Wafer wird entlang der vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 6: Aufbau von Mikrokompartments mit photolithographisch strukturierten Polymeren

Elektrische Sensorarrays, wie sie nach Beispiel 1-4 aufgebaut wurden, werden mit
5 Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und
Reinstwasser gewaschen. Anschließend werden sie im Spincoat-Verfahren mit Teflon AF
(DuPont) mit einem 15 µm dicken Film beschichtet. Zuvor wird der gesamte Wafer mit
dem zugehörigen Haftmittel (DuPont) benetzt. Nach Ausbacken der Teflonschicht bei
10 150°C für 20 Minuten werden mittels reaktivem Trockenätzen die Gebiete der
Sensorpositionen und der Kontaktpads bis zu den metallischen Oberflächen freigelegt.
Der Wafer wird entlang der vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen
Chips erhalten werden.

Beispiel 7: Immobilisierung von Oligonukleotiden auf elektrischen Sensorarrays

15 Ein nach Beispiel 5 hergestellter Chip mit 400 µm hohen polymeren Mikrokompartments
wird auf einen Keramikträger mit üblichen Leiterbahnen montiert und drahtgebondet.
Durch Aufkleben eines polymeren Formteils aus Polysiloxan entlang der Chipkanten, das
die aktiven Elektrodengebiete eingrenzt, wird ein Reaktionsgefäß von ca. 5 mm
20 Durchmesser auf dem Chip befestigt. In dieses Reaktionsgefäß wird eine 5 mM Lösung
von 11-Merkapto-undecanyl-amin in Cyclohexanon, eingefüllt, abgedeckt und bei
Raumtemperatur für 5 Stunden belassen. Die Belegung der Elektroden durch Self-
assembly wird kontrolliert durch eine Online-Impedanz-Messung (EG&G Model 398).
Die abnehmende Kapazität durch die Belegung mit der monomolekularen Molekülschicht
25 ist ein Maß für die Bedeckung. Die Belegung wird abgebrochen, wenn die ursprüngliche
Kapazität der Chipelektroden um 70% abgesunken ist.

Diese Belegung der Metalloberflächen kann alternativ auch vor dem Brechen und
Vereinzeln der Chips durch Tauchen des gesamten vorher entlackten Wafers in die
30 analogen Lösungen vorgenommen werden.

Die mit Aminofunktionen derivatisierte Oberfläche des Chips wird anschließend mit einem
Tropfen (0,1 - 10 µl) 20 mM Tolylen-2,4- diisocyanat (TDI) in Essigsäureethylester (EEE)
bei RT während 10 - 60 min inkubiert. Es wird mit EEE gewaschen und getrocknet.

35 Nach Waschen eines so aktivierten Chips mit neutraler Phosphatpufferlösung werden
mittels Mikrokapillardosierung nacheinander in jede Sensorarrayposition je 5nl 24mer-
Oligonukleotid eingebracht, die am 5'-Terminus eine Jodoacetyl-Gruppe tragen.

Die Nucleotidsequenz ist an jeder Arrayposition unterschiedlich entsprechend der zu analysierenden verschiedenen Ziel-DNA-Moleküle. Dabei sind die Volumina der Reaktionsflüssigkeiten kleiner als das Kompartimentvolumen. Die Kopplungsreaktion erfolgt spontan während einer Stunde bei Raumtemperatur. Nach erfolgter kovalenter Anbindung wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen.

Beispiel 8: Affinitätsbindung von DNA auf elektrischen Sensorarrays mit trägergebundenen Oligonucleotiden

Auf ein nach Beispiel 7 mit unterschiedlichen Fängeroligonukleotiden beladenes elektrisches Sensorarray wird der Analyt als DNA – Gemisch aufgegeben. Es wird Analyt-DNA verwendet, in welche bei der konventionellen Vervielfältigung der DNA mittels PCR biotinylierte Primer Biotin-Reste eingeführt wurden. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5g Ficoll, 0,5g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g RSA in 0,5 l H₂O) in eine Konzentration von 1 µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40° C mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H₂O) gewaschen.

Beispiel 9: Immobilisierung von partikelgebundenen affinitätsbindenden Molekülen auf elektrischen Sensorarrays

Ein elektrisches Sensorarray, das nach Beispiel 1 hergestellt und nach Beispiel 5 mit Mikrokompartments versehen wurde, wird über einem üblichen Magneten zur Handhabung magnetischer Carrier plaziert. In jedes Mikrokompartiment werden durch Mikrokapillardosierung 10nl Flüssigsuspensionen magnetischer Polymerkügelchen mit unterschiedlichen Oligonukleotiden appliziert und durch die Magneten am Boden der Mikrokompartments über den Elektroden fixiert. Die Beladung der magnetischen Träger erfolgte zuvor separat für alle Positionen nach einem Standardverfahren (Boehringer) durch Streptavidin/Biotin-Kopplung. Die Träger sind dabei oberflächlich mit Streptavidin beschichtet und binden die 5' -biotin-modifizierten 24mer-Nukleotide. Über die Streptavidin/Biotin-Bindung wurden unterschiedliche Oligonukleotide fest auf den magnetischen Trägern immobilisiert.

Beispiel 10: Detektion der Affinitätsbindung an Oberflächen von elektrischen Sensorarrays

Elektrische Sensorarrays mit immobilisierten Oligonukleotiden nach Beispiel 7 werden nach Hybridisierung analog Beispiel 8 zur Auslesung mittels Redox-Recycling vorbereitet. Dazu wird das gesamte elektrische Sensorarray mit 1,5 µl einer neutralen Phosphatpufferlösung des Markerenzym alkalische Phosphatase, die als Streptavidinkonjugat vorliegt, befüllt. Die Biotin/Streptavidin-Bindung erfolgt während einer Stunde. Danach werden alle nicht gebundenen Enzymkonjugate mittels 2 mM p-Aminophenylphosphat in Phosphatpuffer pH 9,5 von der Sensoroberfläche weggespült. Nach Absaugen aller über die Mikrokompartments überstehenden Flüssigkeit wird die in jedem Mikrokompartiment durch die Enzymreaktion entstehende p-Aminophenolkonzentration, die der Menge doppelstranggebundener DNS adäquat ist, individuell mit einem 16-Kanal-Multipotentio- (Eigenbau) gemessen. Für das Redox-Recycling werden die Ultramikroelektroden paarweise mit 2 verschiedenen Potentialen beaufschlagt. Die Anode mit + 350 mV und die Kathode mit – 100 mV gegen eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode (sh. Figur 7). Der anodische und der kathodische Strom jeder Arrayposition wird als Stromanstieg di/dt an der jeweiligen Sensorposition ausgewertet. Man erhält einen Stromanstieg von 0,5 bis 2 nA pro Minute je nach Beladungsdichte. Die Summe beider Ströme ist ein quantitatives Maß für die Anzahl gebundener Ziel-DNA an jeder Sensorposition.

Die Menge gebundener DNA pro Sensorposition wird dadurch bestimmt, daß eine Arrayposition des Sensorarray als interner Standard benutzt wird. Dazu wird dem Analyten ein 35mer-Oligonucleotid, welches 20 komplementäre Basen zu dem Fängeroligonucleotid an einer Arrayposition aufweist in bekannter Konzentration beigemischt.

Beispiel 11: Detektion der Affinitätsbindung auf Oberflächen von elektrischen Sensorarrays mittels Impedanzspektroskopie

Elektrische Sensorarrays, die nach Beispiel 6 aufgebaut werden, werden an jeder Sensorarrayposition mit 10nl Oligonukleotidlösung in einer Konzentration von 10 µg pro ml Phosphatpuffer pH 7 befüllt. Die 24-mer-Oligonukleotide besitzen einheitlich 6 Thymidin-Reste am 5'-Kettenende, deren letzte 3 mit Thiolat-Gruppen modifiziert sind. Nach 12 Stunden ist die Schwefel/Gold-Bindung der Thiolatgruppen beendet.

Bei Raumtemperatur wird jede Arrayposition mittels Impedanzspektroskopie (EG&G Model 392) in einem Frequenzbereich zwischen 10mHz und 1MHz vermessen und die komplexe Impedanz analysiert.

- 5 Das Sensorarrays wird mit SSPE-Puffer (0,9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5g Ficoll, 0,5g Polyvinylpyrrolidon, 0,5g RSA in 0,5l H₂O) in eine Konzentration von 1µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40°C Mit SSC-Puffer
10 (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H₂O) gewaschen.

Bei Raumtemperatur wird jede Arrayposition mittels Impedanzspektroskopie in einem Frequenzbereich zwischen 10mHz und 1MHz erneut vermessen und die komplexe Impedanz analysiert.

- 15 Die Differenz der Messungen an jeder Sensorarray-Position vor und nach DNA-Bindung zeigt im Falle der Erniedrigung des elektrischen Leitfähigkeitstherms der komplexen Impedanz die Position mit erfolgter DNA-Bindung an.

- 20 Beispiel 12: Transport geladener Moleküle zu Detektorelektroden des elektrischen Sensorarrays

Die Analyt-DNA in 200 mmol/l Bernsteinsäure-Puffer pH 5,1 wird mit einer Konzentration von ca. 1 µg/ml auf das Sensorarray aufgegeben.

- 25 Mit Hilfe einer externer Präzisionsstromquelle wird auf alle Elektroden 3e' und 3 ein Strom von 20 nA für 80 msec aufgeprägt. Danach wird für 80 msec auf die Elektroden 3e und 3' umgeschaltet. Die Elektroden 3 und 3' sind dabei positiv gepolt. Die gesamte Schaltsequenz wird 100 mal wiederholt. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird
30 dann bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H₂O) gewaschen.

Beispiel 13: Elektrische Stringenzbehandlung von hybridisierter DNA auf elektrischen Sensorarrays

- 35 Ein elektrisches Sensorarray mit hybridisierter DNA, wie im Beispiel 12 verwendet, wird mit einer 200 mmol/l Bernsteinsäure-Puffer pH 5,1 beaufschlagt.

Mittels einer externen Stromquelle wird 10nA Wechselstrom von 50 Hz Strom für 0,2sec auf alle Elektrodenpare 3, 3' aufgebracht. Nach einer Pause von 0,2sec wird die gesamte Schaltsequenz 100 mal wiederholt. Abdiffundierte schwächer gebundene Moleküle werden dann bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6g NaCl, 26,5g Na-Citrat in 0,8l H₂O) weggewaschen.

Beispiel 14: Selektive Desorption von oberflächengebundenen Molekülen auf elektrischen Sensorarraychips

Ein elektrisches Sensorarray wird nach Beispiel 1 hergestellt und nach Beispiel 7 mit Oligonukleotiden beladen. Dazu werden Elektrodengeometrien an den Sensorarraypositionen gemäß Figur 2e verwendet. In den Probenring wird pH 5,1 eingefüllt.

Alle Elektroden 3 und 3' auf dem Sensorarray werden an eine Stromquelle angeschlossen. Nun wird Wechselstrom mit 20 Hz und einer Spannung von 2V für eine Sekunde angelegt und nach einer Pause von 0,5 Sekunden erneut eingeschaltet. Diese Sequenz wird 50 mal wiederholt. Anschließend wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen.

Die folgende Hybridisierung von Analyt-DNA erfolgt nur noch auf fängerbeladenen Elektroden 3e, 3e' und wird analog Beispiel 8 ausgeführt.

Wie in Beispiel 10 wird mit alkalischer Phosphatase markiert. Mittels Redox-Recycling messen die Elektroden 3 und 3' die p-Aminophenolkonzentration, die auf den Flächen 3e, 3e' produziert wird. Dabei wird der Stromanstieg dl/dt an der jeweiligen Sensorposition ausgewertet. Man erhält einen Stromanstieg von 0.2 bis 2 nA pro Minute je nach Beladungsdichte.

Beispiel 15: Kontrolle und Meßwerterfassung mittels eines ASIC

Ein elektrisches Sensorarray wird analog Beispiel 15 hergestellt, mit Oligonukleotidfängern beladen und zur Affinitätsbindung von Ziel-DNA sowie folgender Enzymmarkierung verwendet. An die 32 Leitungen 6, 6' des Sensorarrays wird ein selbstentwickelter ASIC zur seriellen Elektrodensteuerung mit 32 Schaltausgängen angeschlossen und mit einem Bipotentiostaten verbunden. Die Vorbereitung und Realisierung des Redox-Recycling werden wie nach Beispiel 10 ausgeführt. Die anodischen Potentiale von +350 mV und die kathodischen Potentiale von -100 mV

werden vom Bipotentiostaten an den ASIC angelegt und über die direkten Leiterbahnen zu den einzelnen Sensorpositionen 4 geleitet. Dabei ist jede Sensorposition 4 einem Schaltersystem auf dem ASIC zugeordnet. Prozessorkontrolliert wird nun seriell (nacheinander) durch den Bipotentiostaten jede Sensorposition für 0,1sec ausgelesen.

5 Beim Umschalten einer Arrayposition vom Lese- in den Nichtlesezustand wird mittels des ASIC das anodische und das kathodische Potential auf die jeweilige Biasleitung geschaltet. Alle 16 Arraypositionen arbeiten dadurch kontinuierlich im Redox-Recycling.

10 Dieser serielle Auslesezyklus wird 5min ausgeführt. Der Anstieg des Summenstroms pro Zeit je Arrayposition wird gemessen und wie in Beispiel 10 interpretiert.

Beispiel 16: Kontrolle und Meßerfassung mit teilintegrierter Elektronik

15 Die Adreßleitungen 14, 15 und 16, 17 des Sensorarrays, die in Figur 3 gezeigt sind, werden mit einem PC-gesteuerten Dekoder verbunden. An je eine der Leseleitungen 18, 19 wird ein Kanal eines 8-kanaligen Multipotentiostaten angeschlossen. Die Biasleitungen 20, 21 werden mit analogem anodischen (+350mV) und dem kathodischen Potential (-100mV) wie in Beispiel 15 versorgt.

20 Die Vorbereitung und Realisierung des Redox-Recycling werden wie nach Beispiel 10 ausgeführt.

25 Im Lesezustand werden alle Sensorpositionen in der Spalte entlang den Adreßleitungen 14, 15 aktiviert und durch die integrierten Schalter 12, 12' an die jeweiligen Meßkanäle des Multipotentiostaten geschaltet. Alle anderen Sensorpositionen sind im Nichtlesezustand und durch die integrierten Schalter 13, 13' mit den Biasleitungen 20 bzw. 21 verbunden, so daß auch hier die entsprechenden Potentiale an den Elektroden 3 bzw. 3' anliegen und die Redoxreaktion kontinuierlich abläuft.

30 Prozessorkontrolliert wird nun durch den Multipotentiostaten jede aktive Sensorposition für 0,1sec ausgelesen. Danach wird durch den Dekoder diese Spalte mit Schalter 12, 12' in den Nichtlesezustand versetzt und sofort die nächste Reihe mittels der benachbart liegenden Adreßleitungen adressiert.

35 Dieser Auslesezyklus wird ca. 5 Minuten ausgeführt. Der Anstieg des Stroms pro Zeit wird für jede Sensorposition separat gemessen und im PC gespeichert. Die Auswertung entspricht Beispiel 15. Dargestellt ist die Aufzeichnung in Figur 9.

Beispiel 17: Kontrolle und Meßwerterfassung mit integriertem Zwischenspeicher

Ein elektrisches Sensorarray wird gemäß Beispiel 4 und 5 hergestellt, mit Elektrodengeometrien, die der Figur 2c entsprechen. Die Vorbereitung des elektrischen Sensorarrays mit chemischen Komponenten erfolgt analog Beispiel 15.

Die Adreßleitungen 14, 15 und 16, 17 des Sensorarrays, wie in Figur 4, gezeigt werden mit einem PC-gesteuerten Decoder verbunden, analog Beispiel 15. An jede der Leseleitungen 18, 19 wird ein hochempfindlicher Verstärker mit seinem Ausgang an einen ADC angeschlossen. Die Biasleitungen 20, 21 werden mit analogem anodischen (+350mV) und dem kathodischen Potential (-100mV) aus einem Bipotentiostaten versorgt. Die Adressierung erfolgt wie im Beispiel 16.

Abweichend von diesem Beispiel werden nur die im Nichtlesezustand an den Elektroden 3 und 3' durch Redox-Recycling generierten Ströme durch integrierte Vorverstärker mit internen Integratoren 23, 23' für jede Elektrode einzeln gespeichert. Beim späteren Lesevorgang durch Adressierung wird nur der Inhalt dieser Integratoren abgefragt.

Das dort ablaufende Redox Recycling generiert Strom, der über den internen Verstärker in der Schaltung 23 zum internen positionsspezifischen Integrator geleitet und dort aufsummiert wird. Die Aufsummation geschieht während des gesamten Nichtlesezustandes.

* * *

Ansprüche:

1. Elektrisch ansteuerbare Sensoranordnung mit einer Vielzahl von Arrays (4),
geeignet zur elektrochemischen Detektion molekularer Stoffe und geeignet zum
Transport oder zur Handhabung geladener Moleküle,
gekennzeichnet durch
 - mehr als zwei Sensorpositionen auf einem im wesentlichen planaren
Träger (1), wobei jede Sensorposition als ein Array (4) von zumindest zwei
Mikroelektroden (3a,3a'; 3,3'; 3i,3i') ausgebildet ist;
 - eine erste Leitungsführung (14,15;16,17) zur elektrischen Adressierung jedes
Arrays (4) auf dem Träger (1);
 - eine Anordnung (20,21;13,13') zu einer elektrischen Kontrolle an den
zumindest zwei Arrays (4), mit der nach dem Ende eines elektrischen
Adressiervorgangs (12,12';14,15) die nicht (mehr) adressierten Arrays (4) mit
einer Polarisationsspannung kontinuierlich versorgbar sind;
 - um wahlweise elektrische Gleich- und/oder Wechselfelder an den
Arrays (4) zu erzeugen;
 - um unterschiedliche elektrochemische Reaktionen oder Eigenschaften
individuell an den Arrays (4) zu detektieren;
 - um die - zwischen zwei elektrischen Adressierungen derselben
Sensorposition - an dieser Sensorposition abgelaufenen Ereignisse
elektrisch auszulesen;oder
 - um affinitätsbindende Moleküle auf eines der Arrays (4), an einen dort
befindlichen partikulären Träger oder in ein dort befindliches Gel
unabhängig von optischen Eigenschaften zu transportieren und dort zu
immobilisieren.
2. Sensoranordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der planare
Träger (1) aus Silizium, Glas, Keramik oder Kunststoff besteht.
3. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß
eine Elektrodenoberfläche der Mikroelektroden (3,3a') aus einem Edelmetallfilm, wie
Gold, Platin oder Iridium, oder aus Kohlenstoff besteht.
4. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei die erste Leitungsführung (14,15) eine
individuelle elektrische Adressierung jedes Arrays (Sensorposition) erlaubt.

5. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei die erste Leitungsführung (14,15;16,17) eine zeilen- oder spaltenweise Adressierung mehrerer Sensorpositionen erlaubt und die adressierten Sensorpositionen (101,110) im wesentlichen parallel, aber individuell auslesbar sind.
6. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei die Mikroelektroden an jeder einzelnen Sensorposition mit einer jeweiligen elektronischen Schaltung (13,12;12',13') so adressierbar sind, daß elektrochemische Ereignisse auslesbar sind und Potentiale zur Polarisation ohne Unterbrechung nach einem Auslesen bestehen bleiben, um eine elektrische Doppelschicht an flüssigkeitsbenetzten Elektroden nicht zu beeinflussen.
7. Sensoranordnung Anspruch 1, wobei integrierte Schaltungen als Umschalter (12,13;12',13') im aus Silizium bestehenden planaren Träger (1) vorgesehen sind, oder außerhalb des planaren Trägers (1) angeordnet sind (Figur 6), welche Schaltungen Bestandteil der Anordnung zur elektrischen Kontrolle (20,21;16,17) sind.
8. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei - bei einer seriellen Auslesung - elektrochemische Vorgänge, die bei den Mikroelektroden, insbesondere auch zusätzlichen Elektroden, eines einzelnen Arrays (4) in der Zeit zwischen aufeinanderfolgenden aber zeitlich beabstandeten individuellen Adressierungsvorgängen dieses Arrays (4) ablaufen, dem einzelnen Array zugeordnet, (individuell) erfaßt, gespeichert und/oder aufsummiert werden.
9. Sensoranordnung nach Anspruch 1 oder 5, bei der die Arrays (4) in elektrisch einander zugeordneten Gruppen über die erste Leitungsführung (14,15;16,17) ansteuerbar sind, wobei eine jeweilige Gruppe von Arrays (4) individuell angesteuert wird, bestehend aus zumindest zwei Arrays (4).
10. Sensoranordnung nach Anspruch 1 oder 8, wobei den zumindest zwei, vorzugsweise im wesentlichen allen Sensorpositionen, eine Meß- und Speichereinheit (22,23;22',23') zugeordnet ist, insbesondere bei den Mikroelektroden räumlich eng benachbart angeordnet ist, um die abgelaufenen Ereignisse eine Zeit zu speichern, bevor sie bei einer folgenden Adressierung elektrisch ausgelesen werden.

11. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikro- und Hilfselektrodenoberflächen aus unterschiedlichen Materialien bestehen.
12. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der vorigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß jede einzelne Sensorposition zumindest ein Ultramikroelektrodenpaar gleicher oder verschiedener Geometrie aufweist.
13. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der vorigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die paarweise angeordneten Ultramikroelektroden als interdigitale Fingerelektroden oder als mit punktförmigen Ultramikroelektroden bedeckte Flächen oder Interdigitalanordnungen oder spiral- oder kreisförmig angeordnete Bandstrukturen angeordnet sind.
14. Sensoranordnung nach einem der vorigen Ansprüche, wobei die paarweise angeordneten Ultramikroelektroden mehrschichtig als von Isolatorschichten getrennte bandförmige Metallfilme vertikal gestapelt sind.
15. Sensoranordnung nach einem der vorigen Ansprüche, wobei an jeder einzelnen Sensorposition neben den Ultramikroelektroden zusätzlich weitere flächige oder strukturierte Elektroden, die kein Ultramikroelektrodenverhalten aufweisen und/oder unkontaktierte metallische Flächen angeordnet sind.
16. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorpositionen von Flüssigkeiten bedeckt sind und Reagenzien, Analyte oder Analytgemische jeder einzelnen Sensorposition oder allen Sensorpositionen gleichzeitig zuführbar sind.

17. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 16 dadurch gekennzeichnet, daß an den einzelnen Sensorpositionen affinitätsbindende Moleküle auch mit unterschiedlicher Spezifität auf den einzelnen Elektroden und/oder auf metallischen Hilfsflächen und/oder auf Flächen des Trägers und/oder Kompartimentwandungen so immobilisiert sind, daß voltametrische oder impedimetrische Meßverfahren mit den Ultramikroelektroden ausführbar sind.
18. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der vorigen Ansprüche, wobei an den einzelnen Sensorpositionen affinitätsbindende Moleküle, die auf den Ultramikroelektroden gebunden wurden, durch Desorption oder elektrochemische Oxidation wieder entfernbar sind.
19. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß eine voltametrische Detektion in flüssigen Analyten unabhängig von partikulären Bestandteilen und/oder aufliegenden Gelen und/oder anhaftenden Substanzen vorgenommen wird, insbesondere als Verfahren oder Verwendung des Sensorarrays.
20. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der vorigen Ansprüche, wobei eine impedimetrische Detektion in flüssigen Analyten unabhängig von insbesondere schwebenden partikulären Bestandteilen vorgenommen wird.
21. Sensoranordnung zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der vorigen Ansprüche, wobei an jeder Sensorposition individuelle molekulare Bindungsereignisse elektrochemisch detektiert werden, nachdem Analyte aus Stoffgemischen an die auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle spezifisch gebunden worden sind.
22. Sensoranordnung nach einem der vorigen Ansprüche, wobei an jeder Sensorposition individuell das Ausbleiben molekularer Bindungsereignisse detektiert wird, nachdem Analyte aus Stoffgemischen mit den auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Molekülen eine spezifische Bindung eingegangen sind.

23. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei an jeder Sensorposition individuelle molekulare Bindungsereignisse nach Bindung von Analyten aus Stoffgemischen an die auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle dadurch mit den Ultramikroelektroden detektiert werden, daß redoxaktive Reaktionsprodukte bindungsspezifisch eingebrachter Enzymmarker qualitativ und/oder quantitativ erfaßt werden.
24. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei die einzelnen Sensorpositionen durch volumenseparierende Kompartments so abtrennbar sind, daß eine positionsspezifische quantitative elektrochemische Detektion möglich ist.
25. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei die Ultramikroelektroden aus Edelmetall und wahlweise weitere flächige oder strukturierte Elektroden und/oder unkontaktierte metallische Flächen gleichzeitig als Immobilisierungsflächen für Selfassembling-Monoschichten unterschiedlicher thiolmodifizierter affinitätsbindender Moleküle auf den verschiedenen Sensorpositionen genutzt werden.
26. Sensoranordnung nach Anspruch 25, wobei die Ausbildung von Selfassembling-Monoschichten so ausgeführt wird, daß auf allen Sensorpositionen eine gleichartige Beschichtung mit bifunktionellen thiolmodifizierten Molekülen vorgenommen wird, die in einem zweiten Reaktionsschritt zur Bindung gleicher oder unterschiedlicher affinitätsbindender Moleküle auf jeder einzelnen Sensorposition genutzt werden.
27. Sensoranordnung nach Anspruch 24 oder 25, wobei die an den einzelnen Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle mit einer Schicht aus Hydrogelen belegt werden, die insbesondere auch das gesamte elektrische Sensorarray bedecken.
28. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei in Kompartments an den einzelnen Sensorpositionen unterschiedliche affinitätsbindende Moleküle, die an Polymere oder an Nanopartikel aus Metallen oder mineralischen Stoffen oder in gelartigen Substanzen trägergebunden sind, eingebracht und fixiert werden.

29. Sensoranordnung nach Anspruch 1 oder 22 oder 27, wobei die an einzelnen Sensorpositionen eingebrachten und an partikulären Trägern immobilisierten affinitätsbindender Moleküle zusätzlich in einer Schicht aus Hydrogelen fixiert werden, die wahlweise auch das gesamte elektrische Sensorarray bedecken kann.
30. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei zwischen den Ultramikroelektrodenpaaren der verschiedenen Positionen des elektrischen Sensorarrays, wahlweise unter Einbeziehung von Hilfselektroden des Sensorarrays, solche elektrischen Felder erzeugt werden, daß geladene Moleküle nach elektrophoretischen Prinzipien bewegbar sind.
31. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei zwischen den Ultramikroelektrodenpaaren der verschiedenen Positionen des elektrischen Sensorarrays, insbesondere unter Einbeziehung von Hilfselektroden des Sensorarrays, solche elektrischen Wechselfelder erzeugbar sind, daß gebundene Analytmoleküle abhängig von Bindungsstärke und Ladung von den einzelnen Sensorpositionen entfernbar sind.
32. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei eine zweite Leistungsführung (18,19) dem Träger (1) zugeordnet ist, zur Übertragung von Meßsignalen (C,D) aus der von der ersten Leitungsführung (14,15) adressierten Sensorposition (100).
33. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei bei der elektrischen Adressierung - über die erste Leitungsführung (14,15) im Träger - eine Detektion oder Reaktion bei der adressierten Sensorposition (100) erfolgt, insbesondere unter Stromverbrauch.
34. Sensoranordnung nach Anspruch 1 oder 33, wobei bei der elektrischen Kontrolle - über eine zweite Leitungsführung (18,19) im Träger - eine Detektion oder Reaktion bei der, insbesondere bei allen nicht adressierten Sensorpositionen (101) erfolgt, insbesondere unter Stromverbrauch.
35. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei der Adressiervorgang über die erste Leitungsführung (14,15) erfolgt und eine zweite Leitungsführung aus dem Träger (1) zugeordneten Bahnen (18,19), insbesondere im wesentlichen senkrecht zur ersten Leitungsführung, vorgesehen ist, welche zweite Leitungsführung Bestandteil der Anordnung zur elektrischen Kontrolle der zum Lesen nicht adressierten Sensorpositionen (101,102,111,112) ist.

36. Sensoranordnung nach Anspruch 1, wobei die Kontrollanordnung eine stromtragfähige Direktverbindung (20,13',13a'; 21,13,13a) der Elektroden (6,6';3,3') der Sensorpositionen (4,100,101) zu mindestens einem Stromfluß bereitstellenden Potential (E,F) enthält, das bevorzugt außerhalb der Sensorpositionen vorgesehen ist.
37. Sensoranordnung nach Anspruch 36, wobei die Kontrollanordnung im wesentlichen verlustfreie Direktverbindungen (20,13',13a'; 21,13,13a) von beiden Elektroden (6,6';3,3') einer jeweiligen Sensorpositionen zu einem Stromfluß bereitstellenden Potential oder einer Potentialdifferenz (E,F), insbesondere fernab von den Sensorpositionen enthält.
38. Elektrisch ansteuerbare Sensoranordnung mit einer Vielzahl von Arrays (4), geeignet zur elektrochemischen Detektion molekularer Stoffe und geeignet zum Transport oder zur Handhabung geladener Moleküle, gekennzeichnet durch
- mehr als zwei Sensorpositionen auf einem im wesentlichen planaren Träger (1), wobei jede Sensorposition als ein Array (4) von zumindest einem, vorzugsweise zwei Mikroelektroden (3a,3a'; 3,3'; 3i,3i') ausgebildet ist;
 - erste Leitungen (14,15;16,17) zur elektrischen Adressierung jedes Arrays (4) auf dem Träger (1) und zum Koppeln zumindest einer ausgewählten der Mikroelektroden an zumindest eine Meßleitung (18,19);
 - zweite Leitungsbahnen (20,21;13,13') zu einem Anlegen einer mit Strom belastbaren elektrischen Polarisationsspannung an die zumindest zwei Arrays (4), wobei nach dem Ende eines jeweiligen Adressiervorgangs das nicht (mehr) adressierte Array (4) im wesentlichen kontinuierlich versorgbar ist.
39. Sensorarray nach Anspruch 1 oder 38, wobei jeder Elektrode (3,3') eines Arrays (4) als Sensorposition ein Umschalter (12,12',13,13') zugeordnet ist, um die Elektroden (3,3') des Arrays zwischen einer Meßleitungsführung (18,19) und einer zweiten Leitungsführung (20,21) zur Bereitstellung einer Erhaltungsspannung (E,F) umzuschalten oder mit den einen oder den anderen Leitungen zu koppeln.

40. Ansteuerverfahren für eine Sensoranordnung mit einer Vielzahl von Arrays (4) aus jeweils zumindest zwei Mikroelektroden (3a,3a'; 3,3'; 3i,3i'), wobei die Sensoranordnung eine erste Anordnung (12,12';14,15;16,17) zur Adressierung jedes Arrays (4) auf dem Träger (1) aufweist;

- um wahlweise elektrische Gleich- und/oder Wechselfelder an den Arrays (4) zu erzeugen;
- um unterschiedliche elektrochemische Reaktionen oder Eigenschaften individuell an den Arrays (4) zu detektieren;
- um die - zwischen zwei elektrischen Adressierungen derselben Sensorposition - an dieser Sensorposition abgelaufenen Ereignisse elektrisch auszulesen;

oder

- um affinitätsbindende Moleküle auf eines der Arrays (4), an einen dort befindlichen partikulären Träger oder in ein dort befindliches Gel unabhängig von optischen Eigenschaften zu transportieren und dort zu immobilisieren;

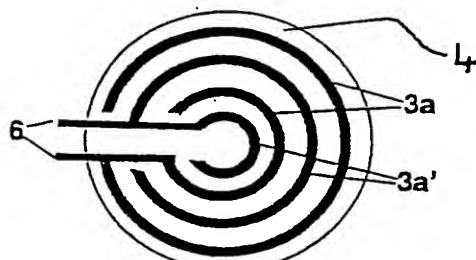
gekennzeichnet durch

eine elektrischen Kontrolle an den nicht adressierten Arrays (4), wobei nach dem Ende eines Adressiervorgangs (12,12';14,15) die nicht (mehr) adressierten Arrays (4) mit einer im wesentlichen konstanten Polarisationsspannung weiterhin versorgt werden.

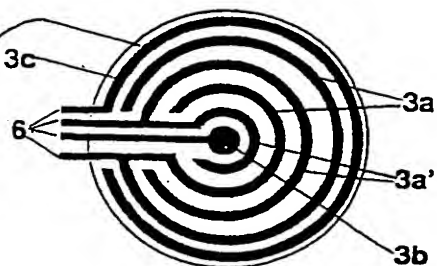
41. Ansteuerverfahren nach Anspruch 40, wobei die im wesentlichen konstante Polarisationsspannung ihre Spannung auch dann beibehält, wenn in der Zeitspanne der elektrischen Kontrolle durch die nicht adressierten Arrays (4) Strombelastungen entstehen.

42. Verfahren nach Anspruch 39, wobei jedem Array (4) als Sensorposition zumindest zwei Umschaltfunktionen (12,12',13,13') zugeordnet sind, um das Array zwischen einem Meßleitungspaar (18,19) und einer zweiten Leitungsführung (20,21) zur Bereitstellung einer Erhaltungsspannung (E,F) umzuschalten oder mit den einen oder anderen Leitungen zu koppeln.

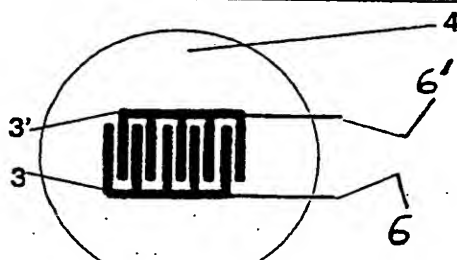
* * *



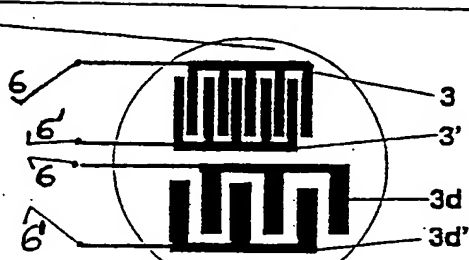
Figur 2a



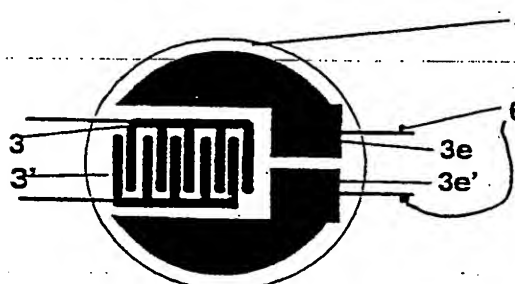
Figur 2b



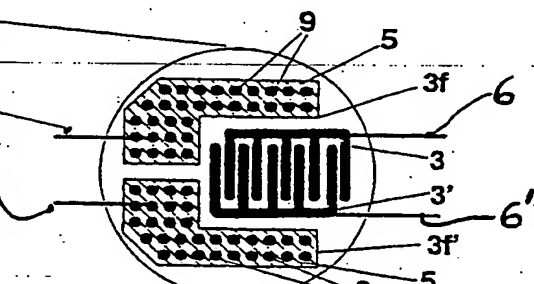
Figur 2c



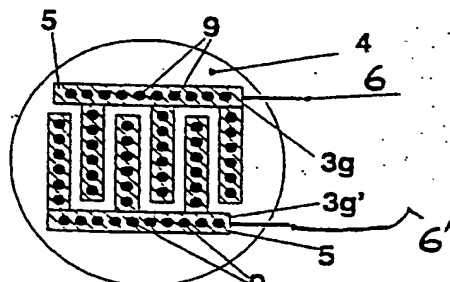
Figur 2d



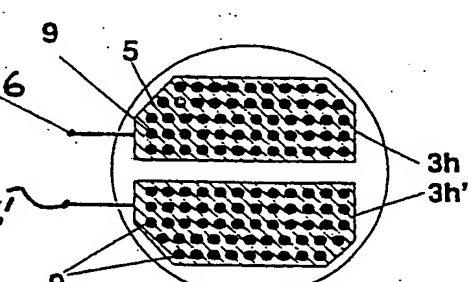
Figur 2e



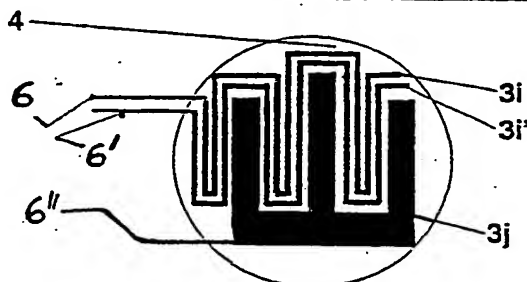
Figur 2f



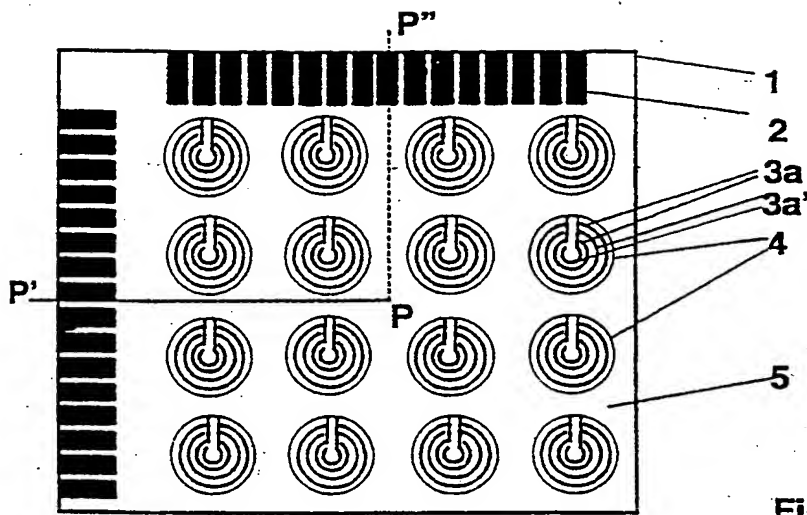
Figur 2g



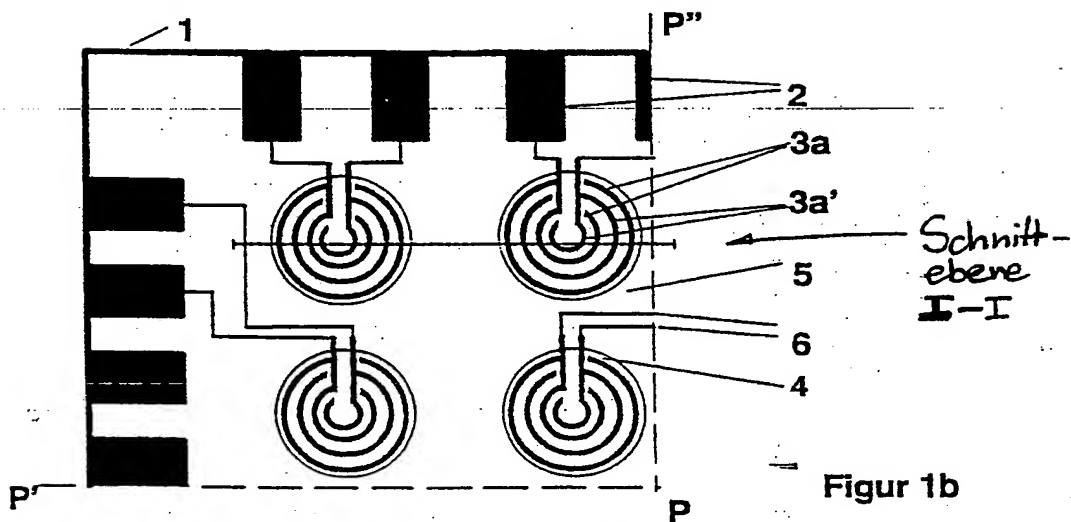
Figur 2h



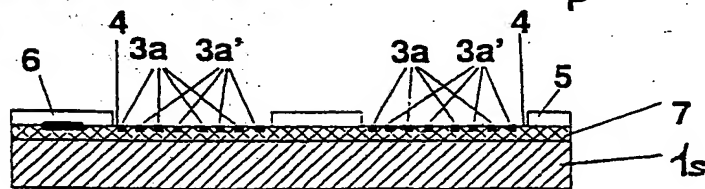
Figur 2i



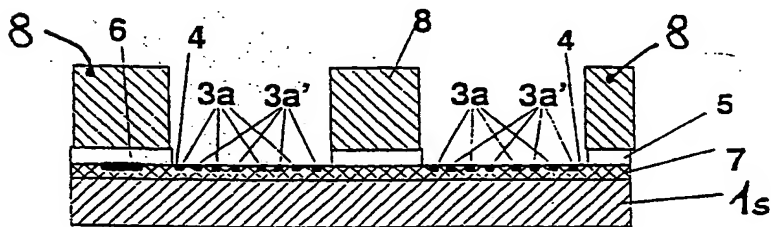
Figur 1a



Figur 1b

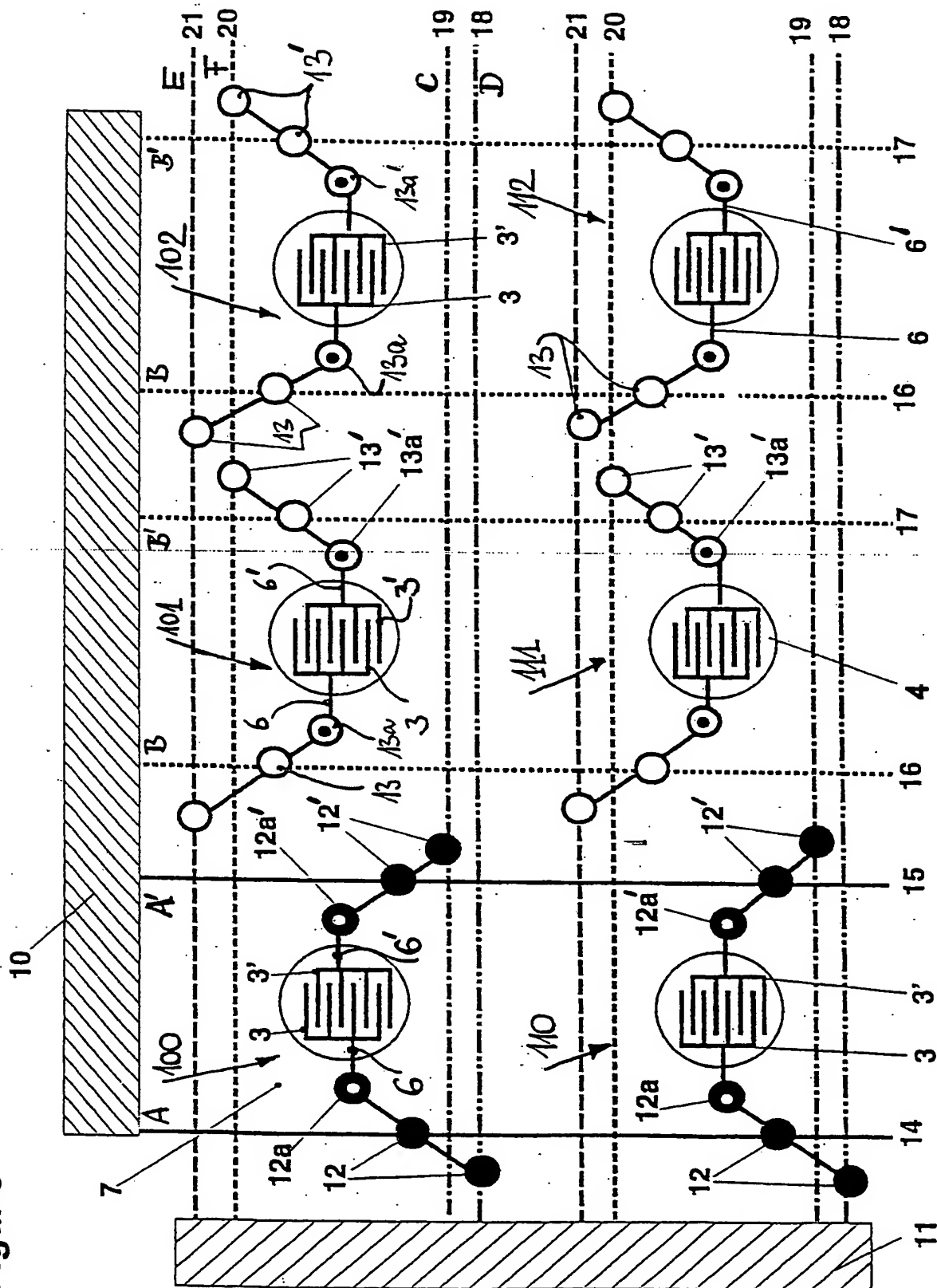


Figur 1c



Figur 1d

Figure 3



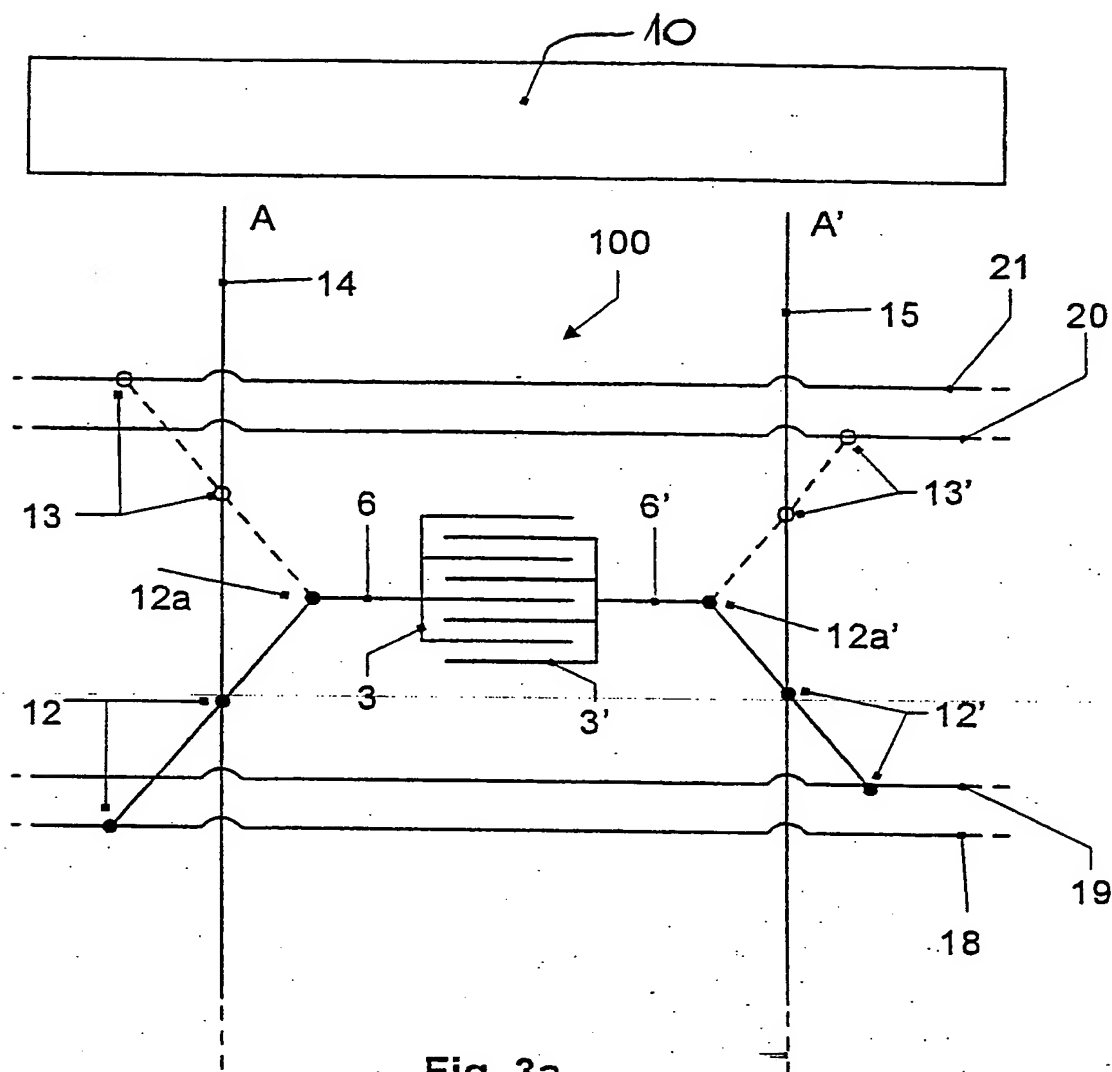
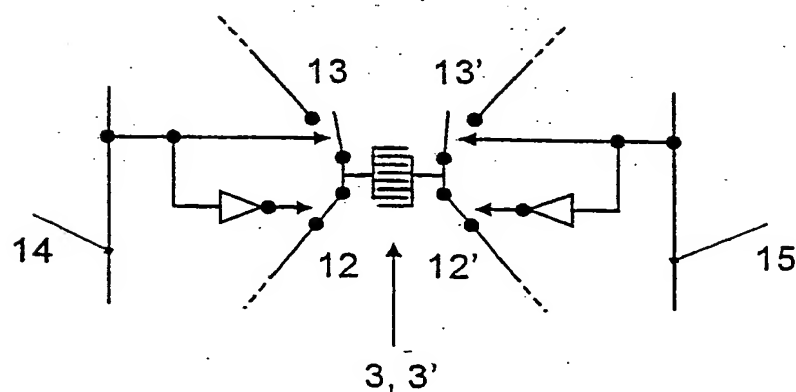


Fig. 3a



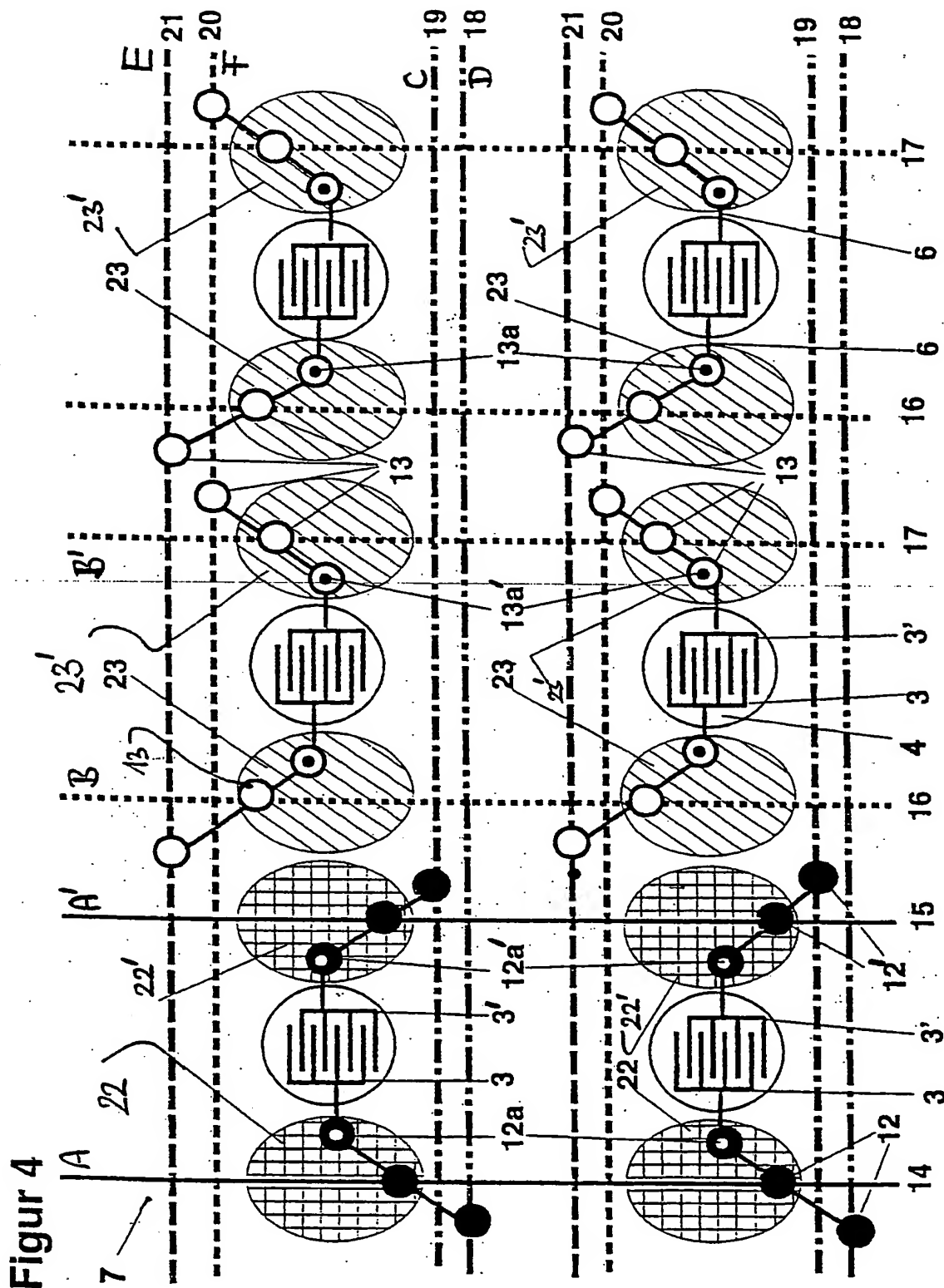
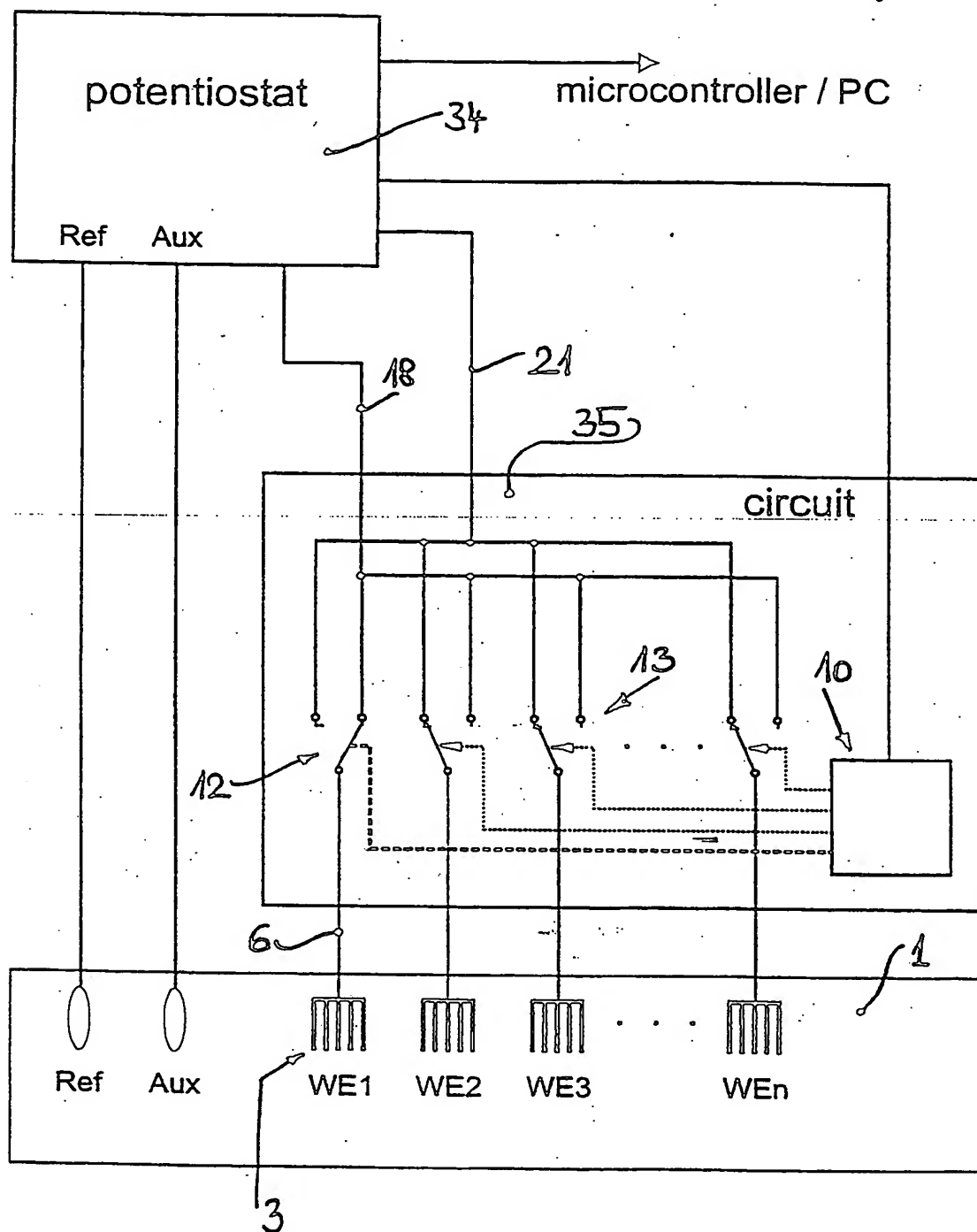


Fig. 6



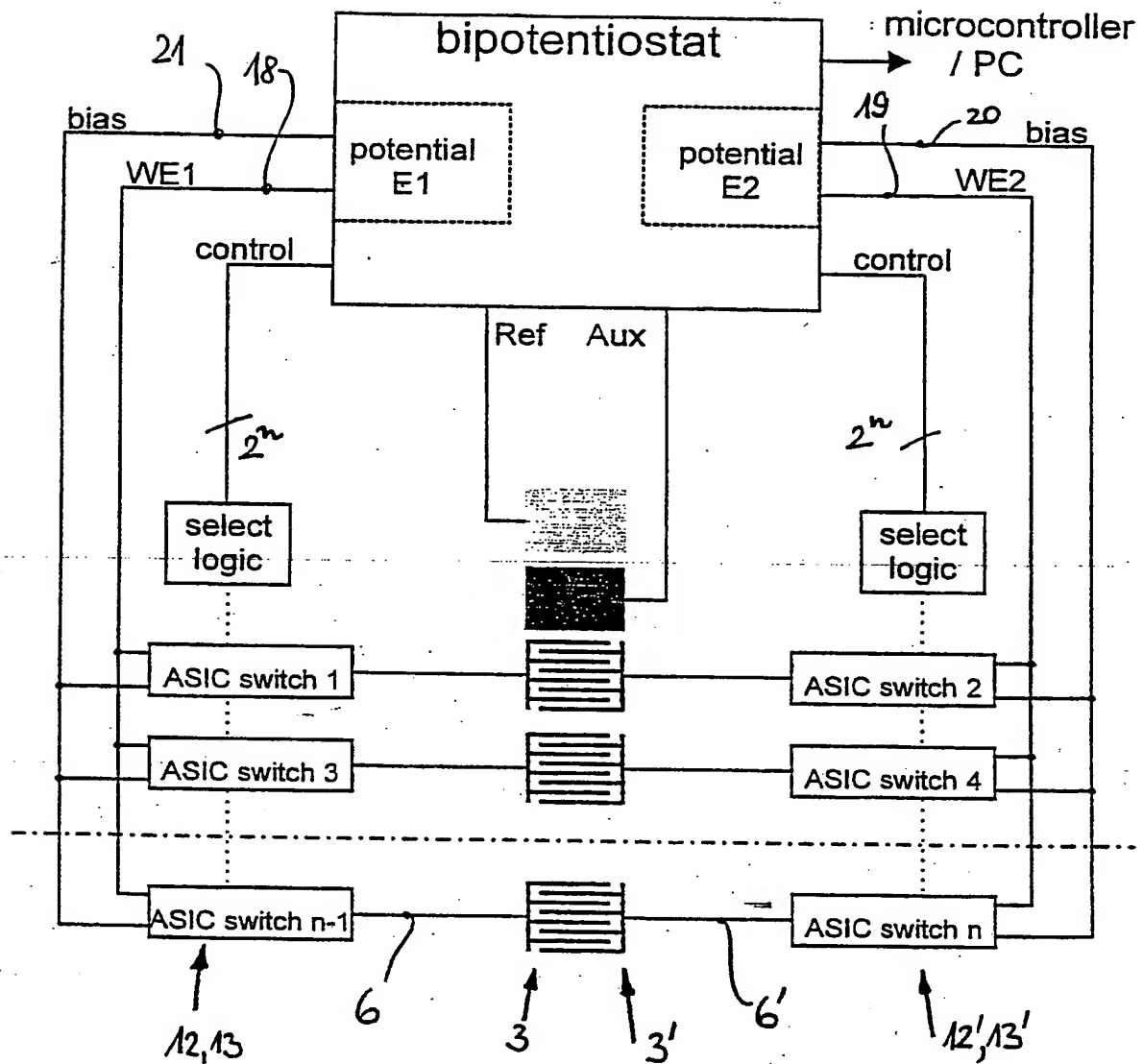


Fig. 7

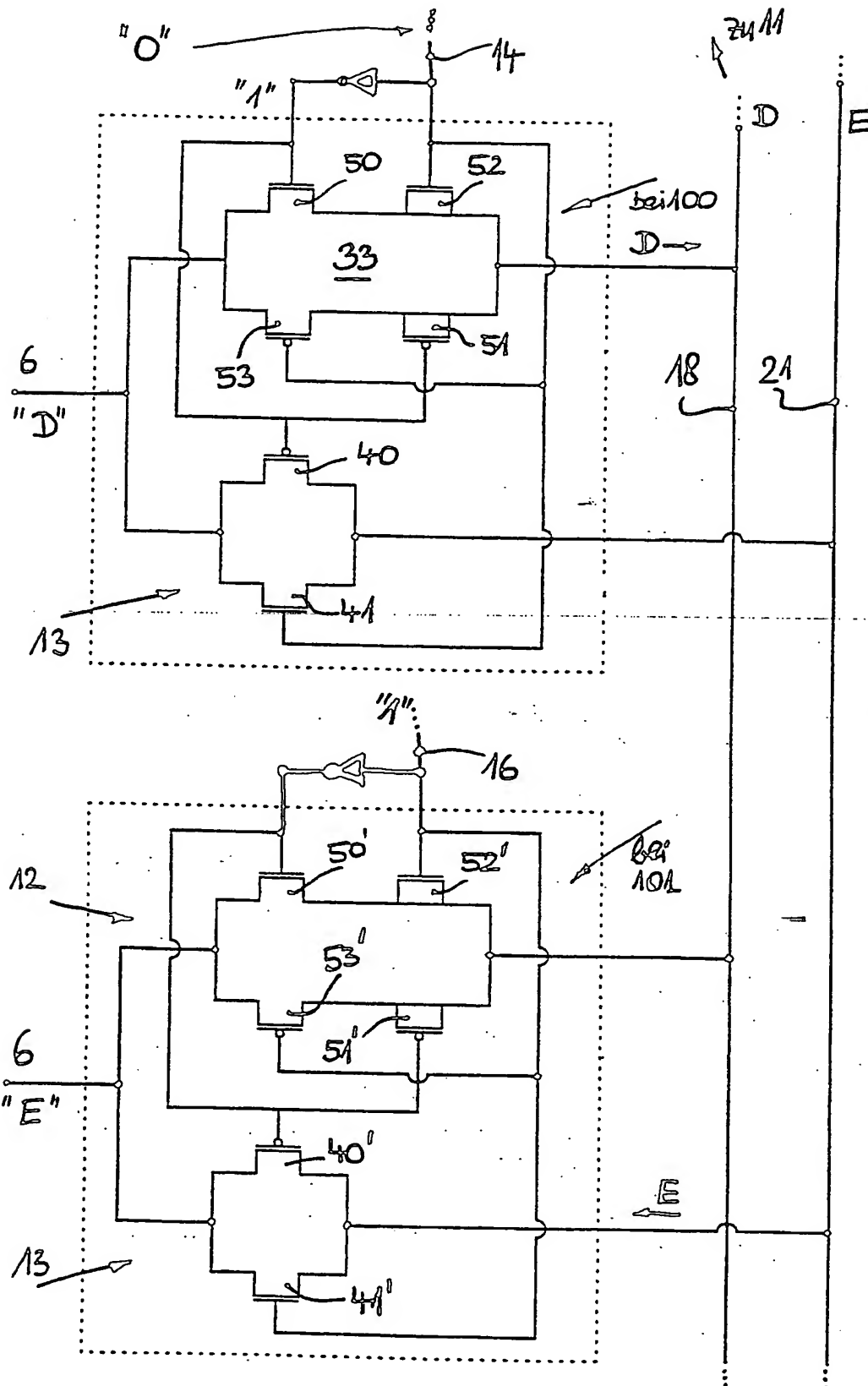
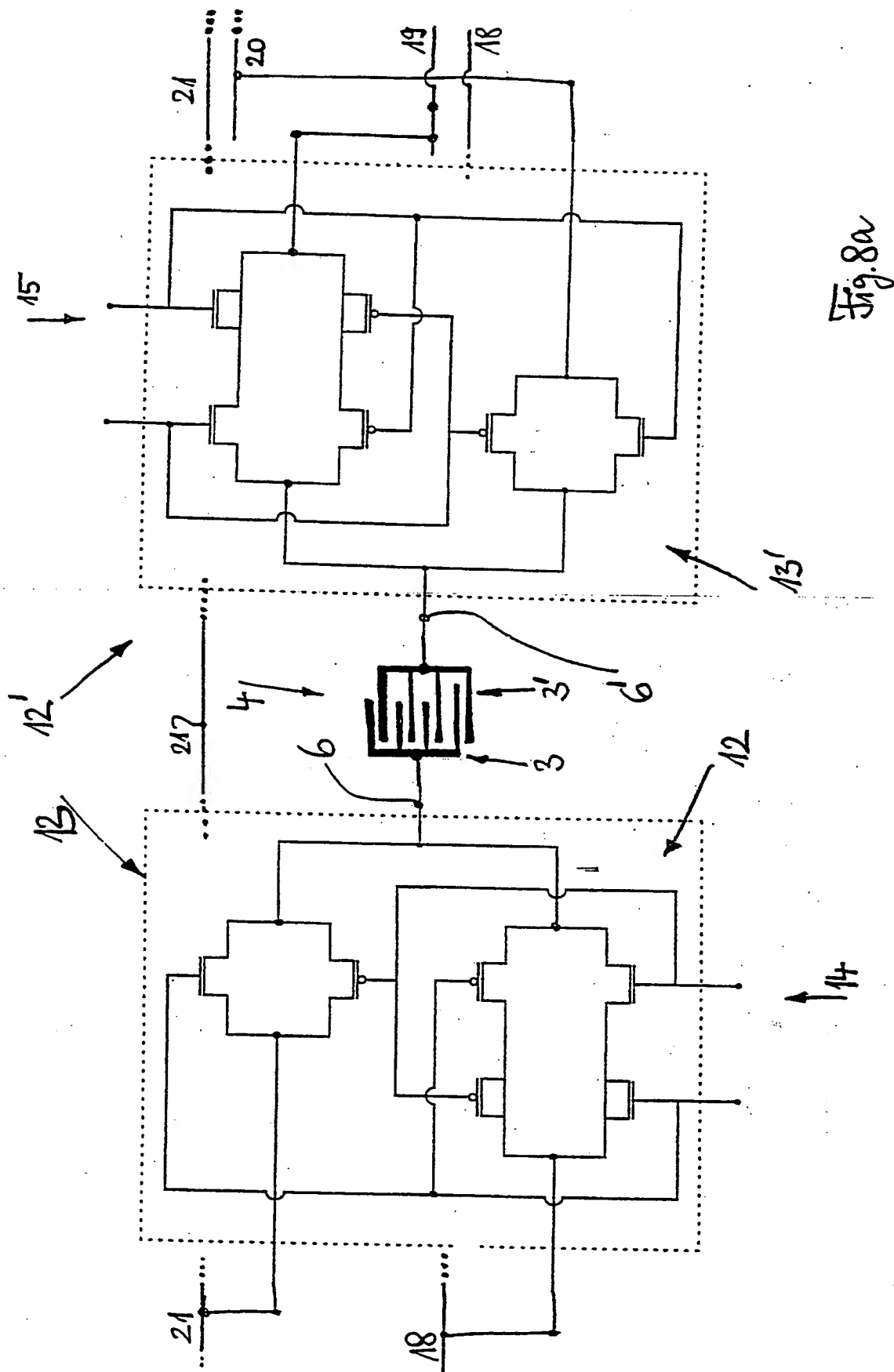
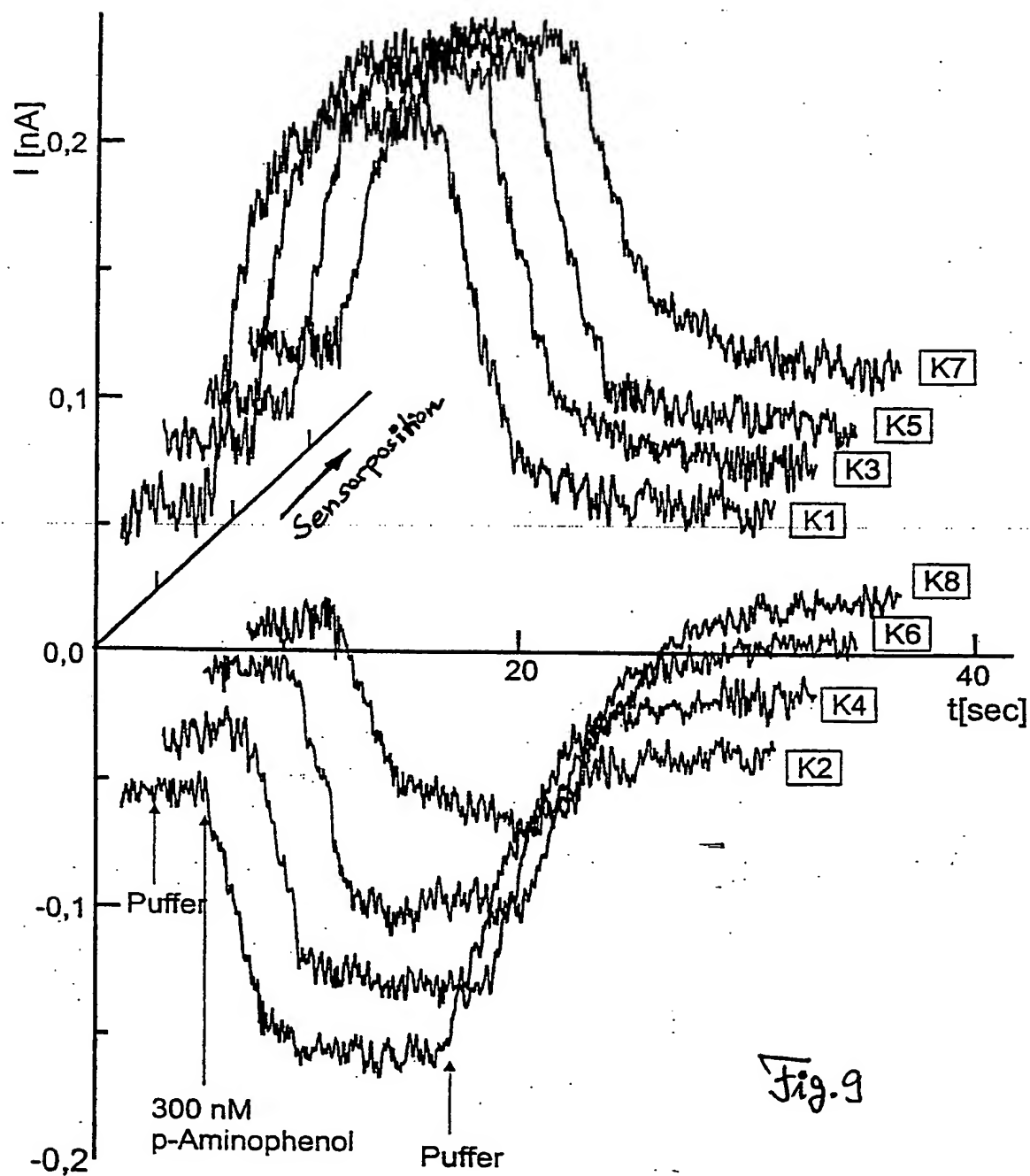


Fig. 8





(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Oktober 2000 (19.10.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/62048 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/403

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03404

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. April 2000 (14.04.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 16 921.7 14. April 1999 (14.04.1999) DE
PCT/EP99/04883 12. Juli 1999 (12.07.1999) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

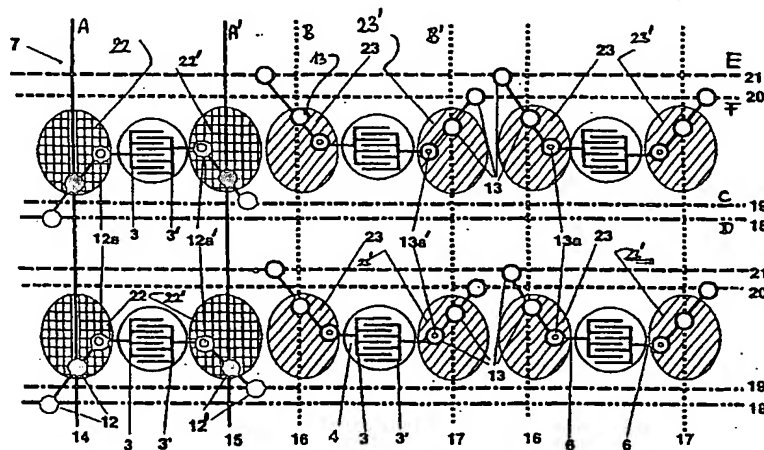
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALBERS, Joerg [DE/DE]; Dorfstrasse 28h, D-25576 Brokdorf (DE). BERNT, Helmut [DE/DE]; Oppelner Strasse 40, D-10997 Berlin (DE). BREDEHORST, Reinhard [DE/DE]; Eichenstrasse 55, D-20255 Hamburg (DE). HINTSCHE, Rainer [DE/DE]; Gravensteinstrasse 61c, D-13127 Berlin (DE). SEITZ, René [DE/DE]; Edendorfer Strasse 174, D-25524 Itzehoe (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SENSOR ARRANGEMENT WITH ELECTRICALLY CONTROLLABLE ARRAYS

(54) Bezeichnung: SENSORANORDNUNG MIT ELEKTRISCH ANSTEUERBAREN ARRAYS



(57) Abstract: Disclosed is an electric sensor array which is provided with several sensor positions that consist of at least two microelectrodes and thereby form an array (4). Molecular substances can be detected electrochemically and charged molecules can be transported or handled by means of said array. Measuring procedures, especially between two respective addressing procedures, are possible according to which the sensor positions can be individually addressed and electrochemically or electrically controlled at any moment. A polarisation voltage between two addressing procedures is thus maintained. The arrangement of the wiring (14, 15; 16, 17) is embodied in such a way that individual arrays or groups of arrays can be controlled. For biomolecular assays, affinity-binding molecules are immobilised in each sensor position, between the microelectrodes or on auxiliary surfaces, thereby representing a possible utilisation of the array. The array can also be used for individual and electrical read-out. The array can further be used for subsequently measuring events between the addressing procedures, whereby said events took place before measurement addressing occurs.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein elektrisches Sensorarray vorgeschlagen, das mehrere Sensorpositionen aufweist, die als jeweils ein Array (4) aus zumindest zwei Mikroelektroden bestehen. Mit diesem Array können molekulare Stoffe elektrochemisch detektiert werden, geladene Moleküle können transportiert oder gehandhabt werden.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/62048 A3



(74) Anwälte: LEONHARD, Reimund usw.; Leonhard Olgemöller Fricke, Postfach 10 09 57, D-80083 München (DE).

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): DE, JP, US.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

26. April 2001

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Ebenfalls möglich sind Messvorgänge, insbesondere zwischen zwei jeweiligen Adressiervorgängen, nachdem die Sensorpositionen individuell adressierbar sind und jederzeit elektrochemisch bzw. elektrisch kontrollierbar sind, zur Aufrechterhaltung einer Polarisationsspannung zwischen zwei Adressiervorgängen. Die Leitungsführung (14, 15; 16, 17) ist so ausgebildet, dass einzelne Arrays oder Gruppen von Arrays ansteuerbar sind. Für Biomolekulare Assays werden affinitätsbindende Moleküle an jeder Sensorposition oder zwischen den Mikroelektroden oder auf Hilfsflächen immobilisiert, was eine mögliche Verwendung des Arrays ist. Eine weitere liegt in der individuellen elektrischen Auslesung und der Möglichkeit, zwischen den Adressiervorgängen abgelaufene Ereignisse nachträglich zu messen, die vor der Messadressierung abgelaufen sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 00/03404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N27/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 01758 A (NANOGEN INC) 15 January 1998 (1998-01-15) page 4, line 25 -page 5, line 22; figure 3	1,38,40
Y	WO 95 26500 A (NEOTRONICS LTD ;IREDALE PETER JULIAN (GB)) 5 October 1995 (1995-10-05) abstract; figure 2	1,38,40
A	WO 99 07879 A (FRAUNHOFER INST SILIZIUMTECHNO ;UNIV SOUTHERN CALIFORNIA (US)) 18 February 1999 (1999-02-18) abstract; figure 3	1
A	WO 96 33403 A (HIGSON SEAMUS PATRICK JOHN ;UNIV MANCHESTER METROPOLITAN (GB)) 24 October 1996 (1996-10-24) abstract	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 2000

Date of mailing of the international search report

09/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 00/03404

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 42 36 421 A (AHLERS HORST DR ING HABIL ;CHRIST ERICH DR SC TECHN (DE)) 11 May 1994 (1994-05-11) abstract; figure 1 ----	1
A	SOSNOWSKI R G ET AL: "RAPID DETERMINATION OF SINGLE BASE MISMATCH MUTATIONS IN DNA HYBRIDS BY DIRECT ELECTRIC FIELD CONTROL" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 94, February 1997 (1997-02), pages 1119-1123, XP000857636 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document ----	1
A	NIWA O ET AL: "HIGHLY SENSITIVE AND SELECTIVE VOLTAMMETRIC DETECTION OF DOPAMINE WITH VERTICALLY SEPARATED INTERDIGITATED ARRAY ELECTRODES" ELECTROANALYSIS,US,VHC PUBLISHERS, INC, vol. 3, 1991, pages 163-168, XP000863401 ISSN: 1040-0397 cited in the application the whole document ----	1
A	US 5 605 662 A (TU EUGENE ET AL) 25 February 1997 (1997-02-25) cited in the application the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/03404

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9801758	A	15-01-1998	US 5965452 A	12-10-1999
			AU 722148 B	20-07-2000
			AU 3717697 A	02-02-1998
			BR 9710271 A	10-08-1999
			CA 2259406 A	15-01-1998
			CN 1255197 A	31-05-2000
			EP 0920624 A	09-06-1999
WO 9526500	A	05-10-1995	AU 2077195 A	17-10-1995
			CA 2186341 A	05-10-1995
			EP 0753141 A	15-01-1997
WO 9907879	A	18-02-1999	AU 8903998 A	01-03-1999
			EP 1003905 A	31-05-2000
WO 9633403	A	24-10-1996	AU 698852 B	12-11-1998
			AU 5340296 A	07-11-1996
			EP 0823050 A	11-02-1998
			JP 11504708 T	27-04-1999
			US 6083366 A	04-07-2000
DE 4236421	A	11-05-1994	NONE	
US 5605662	A	25-02-1997	AU 692800 B	18-06-1998
			AU 8125794 A	23-05-1995
			AU 8522798 A	10-12-1998
			AU 8522898 A	10-12-1998
			BR 9407952 A	26-11-1996
			CA 2175483 A	11-05-1995
			CN 1141078 A	22-01-1997
			EP 0727045 A	21-08-1996
			FI 961843 A	20-06-1996
			JP 9504910 T	13-05-1997
			NZ 275962 A	28-07-1998
			WO 9512808 A	11-05-1995
			US 6068818 A	30-05-2000
			US 6017696 A	25-01-2000
			US 5632957 A	27-05-1997
			US 5849486 A	15-12-1998
			US 5929208 A	27-07-1999
			US 6048690 A	11-04-2000
			US 6051380 A	18-04-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte ^{ales} Aktenzeichen

PCT/EP 00/03404

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N27/403

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 01758 A (NANOGEN INC) 15. Januar 1998 (1998-01-15) Seite 4, Zeile 25 -Seite 5, Zeile 22; Abbildung 3	1,38,40
Y	WO 95 26500 A (NEOTRONICS LTD ;IREDALE PETER JULIAN (GB)) 5. Oktober 1995 (1995-10-05) Zusammenfassung; Abbildung 2	1,38,40
A	WO 99 07879 A (FRAUNHOFER INST SILIZIUMTECHNO ;UNIV SOUTHERN CALIFORNIA (US)) 18. Februar 1999 (1999-02-18) Zusammenfassung; Abbildung 3	1

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 33403 A (HIGSON SEAMUS PATRICK JOHN ;UNIV MANCHESTER METROPOLITAN (GB)) 24. Oktober 1996 (1996-10-24) Zusammenfassung ----	1
A	DE 42 36 421 A (AHLERS HORST DR ING HABIL ;CHRIST ERICH DR SC TECHN (DE)) 11. Mai 1994 (1994-05-11) Zusammenfassung; Abbildung 1 ----	1
A	SOSNOWSKI R G ET AL: "RAPID DETERMINATION OF SINGLE BASE MISMATCH MUTATIONS IN DNA HYBRIDS BY DIRECT ELECTRIC FIELD CONTROL" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 94, Februar 1997 (1997-02), Seiten 1119-1123, XP000857636 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1
A	NIWA O ET AL: "HIGHLY SENSITIVE AND SELECTIVE VOLTAMMETRIC DETECTION OF DOPAMINE WITH VERTICALLY SEPARATED INTERDIGITATED ARRAY ELECTRODES" ELECTROANALYSIS,US,VHC PUBLISHERS, INC, Bd. 3, 1991, Seiten 163-168, XP000863401 ISSN: 1040-0397 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1
A	US 5 605 662 A (TU EUGENE ET AL) 25. Februar 1997 (1997-02-25) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Intr. des Aktenzeichens

PCT/EP 00/03404

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9801758 A	15-01-1998	US 5965452 A AU 722148 B AU 3717697 A BR 9710271 A CA 2259406 A CN 1255197 A EP 0920624 A	12-10-1999 20-07-2000 02-02-1998 10-08-1999 15-01-1998 31-05-2000 09-06-1999
WO 9526500 A	05-10-1995	AU 2077195 A CA 2186341 A EP 0753141 A	17-10-1995 05-10-1995 15-01-1997
WO 9907879 A	18-02-1999	AU 8903998 A EP 1003905 A	01-03-1999 31-05-2000
WO 9633403 A	24-10-1996	AU 698852 B AU 5340296 A EP 0823050 A JP 11504708 T US 6083366 A	12-11-1998 07-11-1996 11-02-1998 27-04-1999 04-07-2000
DE 4236421 A	11-05-1994	KEINE	
US 5605662 A	25-02-1997	AU 692800 B AU 8125794 A AU 8522798 A AU 8522898 A BR 9407952 A CA 2175483 A CN 1141078 A EP 0727045 A FI 961843 A JP 9504910 T NZ 275962 A WO 9512808 A US 6068818 A US 6017696 A US 5632957 A US 5849486 A US 5929208 A US 6048690 A US 6051380 A	18-06-1998 23-05-1995 10-12-1998 10-12-1998 26-11-1996 11-05-1995 22-01-1997 21-08-1996 20-06-1996 13-05-1997 28-07-1998 11-05-1995 30-05-2000 25-01-2000 27-05-1997 15-12-1998 27-07-1999 11-04-2000 18-04-2000